รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาแหนเพื่อเป็นพืชน้ำต้นแบบในการวิจัยพื้นฐานและการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Development of Duckweed as a Model Aquatic Plant for Basic Research and Application in Biotechnology

สลิล ชั้นโรจน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802410
สัญญาเลขที่ 30/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาแหนเพื่อเป็นพืชน้ำต้นแบบในการวิจัยพื้นฐานและการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Development of Duckweed as a Model Aquatic Plant for Basic Research and Application in Biotechnology

สลิล ชั้นโรจน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
กันยายน พ.ศ. 2560

บทคัดย่อ

แหน (duckweeds) เป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุด เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำนิ่ง และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมายเนื่องจากเจริญเติบโตได้ไว มีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูง แต่การศึกษาทางชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพของแหนในประเทศไทยมีอยู่ในวงจำกัด ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงทำการศึกษาและพัฒนาแหนเป็นพืชน้ำต้นแบบ โดยจำแนกสายพันธุ์แหนที่พบในบริเวณแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยบูรพาโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา นำเข้ามาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำให้แหนออกดอก และพัฒนาวิธีการแปลงสภาพเพื่อปรับเปลี่ยนพันธุกรรมแหน จากผลการวิจัยบ่งชี้ว่าแหนที่พบมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แหนใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แหนเล็ก (*Lemna aequinoctialis*) และไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) โดยแหนใหญ่สามารถถูกทำให้ออกดอกได้ 33.45% เมื่อเหนี่ยวนำด้วยกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ความเข้มข้น 3 μM ที่ความเข้มแสง 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ โดยให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 24 วัน นอกจากนี้แหนเล็กสามารถถูกชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) ได้ 100% เมื่อได้รับสาร 2,4-D ความเข้มข้น 3 μM ภายในระยะเวลา 20 วัน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาพบว่าทั้งสองวิธีนั้นยุ่งยากและใช้เวลานานในการดัดแปลงพันธุกรรมแหน ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมคือการเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียน (turion) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ใช้สะสมอาหารในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเลี้ยงแหนใหญ่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 14 วัน จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการแทรกซึมโดยอะโกรแบคทีเรีย (agroinfiltration) ที่มีไบนารีเวคเตอร์ pB7WG ด้วยการนำเอาอากาศออกเป็นระยะเวลา 5 นาที และเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่เติมซูโครสและสาร acetosyringone เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ceftriaxone ความเข้มข้น 250 mg/L และสารปราบวัชพืช glufosinate ความเข้มข้น 0.01 mM เพื่อคัดเลือกแหนใหญ่ดัดแปลงพันธุกรรม เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยวิธีการดังกล่าวจะทำให้ได้แหนใหญ่ที่ต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate 94.10% และมีจีโนไทป์ตรงกับลักษณะการต้านทาน 80% เมื่อนำแหนใหญ่แปลงพันธุ์ (transgenic giant duckweeds) ไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์จะพบการแสดงออกโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) ภายใต้การกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้า แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการแปลงสภาพแหนใหญ่ด้วยวิธีดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อนำแหนใหญ่แปลงพันธุ์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าแหนใหญ่แปลงพันธุ์สูญเสียความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืช แสดงให้เห็นว่าแหนใหญ่ที่ถูกแปลงสภาพนั้นไม่มีความเสถียรทางพันธุกรรม ดังนั้นการพัฒนาขั้นต่อไปคือการทำให้การแปลงสภาพมีความเสถียรเพื่อให้ได้แหนดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
สารบัญ	2
1. บทนำ	4
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
1.2. วัตถุประสงค์การวิจัย	5
1.3. ขอบเขตการวิจัย	5
1.4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
2. วิธีการดำเนินการวิจัย	7
2.1. การบ่งชี้สายพันธุ์แหนโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา	7
2.2. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอก	8
2.3. การชักนำให้เกิดแคลลัสในแหนเล็ก	8
2.4. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	9
2.5. การแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ	9
2.6. การติดตามการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงโดยการควบคุมของ *35S promoter*	11
2.7. การทดสอบแหนที่ผ่านการแปลงสภาพในห้องทดลอง	12
3. ผลการวิจัย	12
3.1. การจำแนกสายพันธุ์แหนด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา	12
3.2. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอก	14
3.3. การชักนำให้เกิดแคลลัสในแหนเล็ก	17
3.4. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	21
3.5. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียน	23
3.6. การหาความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืช glufosinate ในแหน	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7. การแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ	33
3.8. การติดตามการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงโดยการควบคุมของ *35S promoter*	38
3.9. การทดสอบแหนที่ผ่านการแปลงสภาพในห้องทดลอง	39
4. อภิปรายผลการวิจัย	40
4.1. การจำแนกสายพันธุ์แหน	40
4.2. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอก	41
4.3. การชักนำให้เกิดแคลลัสในแหนเล็ก	41
4.4. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียน	42
4.5. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปราบวัชพืช glufosinate ในการคัดเลือกแหนที่ถูกแปลงสภาพ	42
4.6. การแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ	43
4.7. การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงในแหนใหญ่แปลงพันธุ์	44
5. สรุปผลการวิจัย	45
6. ผลผลิต	46
6.1. ผลงานตีพิมพ์	46
6.2. การจดสิทธิบัตร	46
6.3. ผลงานเชิงสาธารณะ	46
รายงานสรุปการเงิน	47
เอกสารอ้างอิง	48
ประวัตินักวิจัย	49

1. บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและมีทรัพยากรที่สามารถนำมาใช้วิจัยเพื่อการพัฒนานวัตกรรมทางชีวภาพได้มาก แต่เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศกำลังพัฒนา แหล่งเงินทุนในการวิจัยจึงมีอยู่จำกัด และขีดความสามารถในการวิจัยจึงมิอาจเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้วได้ ซึ่งประเทศเหล่านี้จะเน้นการวิจัยพื้นฐานเพื่อเป็นแหล่งข้อมูลในการทำวิจัยประยุกต์ต่อไป ดังนั้นเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืนและเหมาะสมกับประเทศไทย การพัฒนาความรู้พื้นฐานควบคู่ไปกับการนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะทำให้ประเทศไทยสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นได้

ปัจจุบันงานวิจัยพื้นฐานทางด้านพืชจะเน้นไปที่พืชต้นแบบคือ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งจัดเป็นวัชพืชบกและขึ้นในสภาพอากาศที่เย็น ข้อได้เปรียบของ *Arabidopsis* คือ มีขนาดเล็กและยังมีขนาดของของจีโนม (genome) เล็กกว่าพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่น เจริญเติบโตเร็วโดยใช้เวลาประมาณ 3 เดือนในแต่ละรุ่น นอกจากนี้ *Arabidopsis* ยังมีแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมและมีการพัฒนากระบวนการทางพันธุวิศวกรรมที่สมบูรณ์ที่สุด ทำให้นักวิจัยส่วนใหญ่เลือก *Arabidopsis* เป็นต้นแบบในการศึกษากระบวนการทางชีววิทยาและชีวเคมีในพืช แต่ข้อเสียของ *Arabidopsis* คือไม่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อการประยุกต์ใช้ได้ และเจริญเติบโตได้ในสภาพอากาศเย็นเท่านั้น ดังนั้นการวิจัยพื้นฐานโดยใช้ *Arabidopsis* จึงไม่เหมาะสมกับการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์ของประเทศไทย

ในทางตรงข้าม แหน (duckweed) ซึ่งเป็นวัชพืชน้ำที่พบทั่วไปในประเทศไทย มีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นพืชต้นแบบในประเทศไทย กล่าวคือแหนซึ่งจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นพืชดอกที่เล็กที่สุด สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและเร็วกว่า *Arabidopsis* นอกจากนี้องค์ประกอบของเนื้อเยื่อไม่มีความสลับซับซ้อน อีกทั้งยังมีขนาดจีโนมใกล้เคียงกับ *Arabidopsis* แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็วในเขตร้อน ดังนั้นพืชตระกูลแหน (*Lemnaoideae*) จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นพืชต้นแบบเพื่อใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาของเซลล์ โครงสร้างและสรีรวิทยาของพืช อณูชีววิทยา ชีวเคมี รวมไปถึงการนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพในประเทศไทย

ดังนั้นการพัฒนาแหนใหญ่เพื่อเป็นพืชต้นแบบจึงมีความสำคัญสำหรับการพัฒนาการเรียนการสอนทางด้านชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืชในประเทศไทย และเพื่อการรองรับข้อมูลทางพันธุกรรมของแหนที่สามารถนำไปใช้ในการทำวิจัยเชิงลึกและวิจัยเชิงประยุกต์ต่อไปในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1. ศึกษาชีววิทยาของแหนในระดับต่างๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในการเรียนการสอนทางด้านพืชในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล และใช้เป็นพืชต้นแบบในการทำวิจัยพื้นฐาน

1.2.2. พัฒนาการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกสายพันธุ์แหนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทำวิจัยเชิงลึกหรือการทำวิจัยเชิงประยุกต์

1.2.3. พัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศกรรมเพื่อรองรับการประยุกต์ใช้กับข้อมูลรหัสพันธุกรรมของแหนและการปรับปรุงพันธุ์

1.3. ขอบเขตการวิจัย

1.3.1. การศึกษาวิจัยในเชิงชีววิทยาของแหน โดยจะมีการนำแหนแต่ละชนิดมาศึกษาโครงสร้างทางชีววิทยาทั้งในระดับเนื้อเยื่อและในระดับเซลล์ มีการศึกษาวงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ รวมถึงการศึกษาทางชีวเคมีและอณูชีววิทยา

1.3.2. การพัฒนาการนำแหนเข้ามาเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง เพื่อการควบคุมตัวแปรต่างๆ และมีการปรับปรุงอาหารเลี้ยง อุณหภูมิ และแสง ที่เป็นระบบ โดยจะมีการคัดเลือกสายพันธุ์แหนที่เหมาะสมในการใช้ประโยชน์ในการทำวิจัยเชิงลึกหรือวิจัยเชิงประยุกต์ต่อไป

1.3.3. การพัฒนาเทคนิคกระบวนการแปลงสภาพแหน (transformation) ที่เหมาะสมประหยัด และเป็นระบบเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์หรือคัดเลือกพันธุ์แหนโดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศกรรม (genetic engineering) หรือเทคนิคการกลายพันธุ์ (mutation) ต่อไป โดยคาดว่าจะสามารถพัฒนาแหนต้นแบบที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอาหาร พลังงานหรือสิ่งแวดล้อมได้ภายในระยะเวลาโครงการ 2-3 ปี

1.4. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ยั่งยืนนั้นต้องอาศัยองค์ความรู้ในเชิงลึก โดยการนำองค์ความรู้นั้นไปต่อยอดในการทำวิจัยเพื่อพัฒนานวัตกรรมใหม่ๆ ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาพืชต้นแบบที่นักวิจัยนิยมนำมาศึกษามีจุดเด่นคือ เจริญเติบโตง่ายและเร็ว มีขนาดข้อมูลทางพันธุกรรม (genome) ที่เล็ก และสามารถดำเนินการตัดต่อทางพันธุกรรมได้ ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือ *Arabidopsis thaliana* อย่างไรก็ดีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นนั้นไม่เพียงพออีกต่อไปแล้ว เพราะคุณสมบัติเพิ่มเติมที่ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสำคัญมากคือความเป็นพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง เป็นต้น แต่ข้อเสียของพืชเหล่านี้คือมีขนาดข้อมูลทางพันธุกรรมที่ใหญ่และการดำเนินการตัดต่อทางพันธุกรรมไม่ง่ายเหมือน *Arabidopsis* นอกเหนือจากนี้ประเทศสหรัฐอเมริกา

กำลังให้ความสนใจในการวิจัยพืชพลังงาน ซึ่งในอดีตมีการนำข้าวโพดมาแปลงเป็นแอลกอฮอล์จำนวนมาก แต่ในปัจจุบันกำลังมีปัญหาเรื่องความสมดุลระหว่างการเพาะปลูกเพื่อเป็นอาหารหรือเพื่อการใช้เป็นพลังงาน ดังนั้นทางออกของปัญหาคือการพัฒนาพืชที่ไม่ได้ใช้เป็นอาหารเพื่อเป็นพืชพลังงาน หนึ่งในนั้นก็คือพืชตระกูลหญ้า เช่น *Branchypodium distachyon* ซึ่งสามารถเข้าถึงข้อมูลของรหัสทางพันธุกรรมของหญ้าชนิดนี้ได้แล้ว แต่ข้อเสียของพืชตระกูลหญ้าคือปริมาณลิกนิน (lignin) ที่มีมากทำให้เกิดปัญหาในการเปลี่ยนเซลลูโลส (cellulose) ไปเป็นแอลกอฮอล์ สำหรับประเทศไทยนั้นเราขาดขีดความสามารถในการแข่งขันในการพัฒนาและวิจัยพื้นฐานเกี่ยวกับพืชที่กล่าวมาข้างต้นได้ ในขณะที่เรามีทรัพยากรและความหลากหลายทางชีวภาพที่เหนือกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว ดังนั้นเพื่อเป็นการริเริ่มการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์ที่ยั่งยืนของเมืองไทย เราควรจะหาจุดเด่นและนำจุดเด่นนั้นเพื่อไปแข่งขันกับประเทศอื่น

เมื่อพิจารณาสภาพภูมิอากาศ และพรรณไม้ในประเทศไทยแล้ว พบว่า แหน (duckweed) เป็นพืชที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิจัยพื้นฐานและวิจัยเชิงประยุกต์ เพราะแหนเป็นวัชพืชน้ำที่ไม่ใช่พืชอาหารหลักของมนุษย์ แต่มีคุณสมบัติต่างๆ ที่ดีกว่า *Arabidopsis* ในการใช้เป็นพืชต้นแบบ ซึ่งมีขนาดเล็ก โตเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศข้ามต้นได้ เหมาะสมในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพราะแหนสัมผัสกับน้ำโดยตรง และข้อมูลทางด้านรหัสพันธุกรรม (genome) จะเข้าถึงได้ในไม่กี่ปีนี้ นอกจากนี้แหนยังมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้เป็นอย่างดี ข้อได้เปรียบในการวิจัยแหนอีกประเด็นคือ ในประเทศที่ให้ความสำคัญต่อการวิจัยพัฒนาพืชส่วนใหญ่ เช่น สหรัฐอเมริกา เนเธอแลนด์ อังกฤษ ญี่ปุ่น จีน เกาหลีใต้ เป็นต้น จะอยู่ในเขตหนาว ซึ่งการวิจัยเกี่ยวกับแหนจึงถูกจำกัดด้วยสภาพภูมิอากาศ อีกทั้งแหนจะไม่ค่อยพบการแพร่ขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศ ดังนั้นสองส่วนนี้จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ แหน ซึ่งเมื่อ 40 กว่าปีที่แล้วเคยมีการเสนอการใช้แหนเป็นพืชต้นแบบ (Hillman, 1976) แต่ไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควรด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตามจุดด้อยสองข้อนี้กลับกลายเป็นจุดเด่นในการวิจัยเชิงประยุกต์ในแหน กล่าวคือ แหนจะเจริญเติบโตได้ดีและเร็วในประเทศเขตร้อนชื้น เช่นประเทศไทย และการแพร่พันธ์โดยไม่อาศัยเพศจะจำกัดการปนเปื้อนของแหนที่ได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์จากแหนที่พบอยู่ในตามธรรมชาติ ดังนั้นแหนจึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เป็นพืชต้นแบบเพื่อการศึกษาวิจัยขั้นพื้นฐานและการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1. การบ่งชี้สายพันธุ์แหนโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

2.1.1. การเตรียมตัวอย่างแหน

ทำการเก็บตัวอย่างแหนจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 ชนิด ได้แก่ แหนใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แหนเล็ก (*Lemna minor*) และไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) จากบริเวณแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาอย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อล้างตะกอนดิน เศษอินทรีย์ และแมลงน้ำหลายชนิดที่ติดอยู่ตามรากและใบของแหนใหญ่ออก จากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อล้างไอออนจากน้ำประปาและตกตะกอนเศษดินที่เหลืออยู่ จากนั้นนำมากำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยใช้สารฟอกขาวไฮเตอร์และล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทั้งหมด 3-5 ครั้งๆละ 5 นาที ตัดแต่งเอาส่วนที่ถูกทำลายออกแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS โดยให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.1.2. การสกัดสารพันธุกรรม

ชั่งตัวอย่างแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำที่ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อน 0.5 g นำมาบดในสารละลาย Edward’s buffer (Edward et al., 1991) 3 ml นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm 10 นาที เทส่วนใสออก แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75% รอให้ตะกอนแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นเพื่อนำไปใช้เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่อไป

2.1.3. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ *Pfu* DNA Polymerase (PL5201, Vivantis) และไพร์เมอร์ *atpF-atpH* (Forward: 5’-ACTCGCACACACTCCCTTTCC-3’; Reverse: 5’-GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT-3’) และใช้รอบ PCR ดังต่อไปนี้ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วินาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที ทั้งหมด 30 รอบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไปตรวจสอบขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (GF-1, Vivantis) และส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป

2.1.4. การเทียบลำดับดีเอ็นเอ

ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากแหนแต่ละสายพันธุ์ จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความใกล้เคียงกับลำดับดีเอ็นเอของแหนสายพันธุ์ต่างๆ จากฐานข้อมูล NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 (Tamura et al, 2013) และสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์โดยใช้วิธี UPGMA เพื่อบ่งชี้ชนิดของแหน

2.2. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอก

2.2.1. การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารเหลวสูตร Hoagland's E pH 5.8 ที่มีการเติมกรดซาลิไซลิก (SA) ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 μM จากนั้นนำมาแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 80 มิลลิลิตร จำนวน 15 ขวด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.2. การเหนี่ยวนำให้ออกดอก

นำแหนใหญ่ปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 14 วัน ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E เป็นเวลา 8 วัน ที่ความเข้มแสง 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 9 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายแหนใหญ่ 3-4 ฟรอนด์ลงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเหลวสูตร Hoagland's E มีเติม SA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (หลอดฟลูออเรสเซนต์) และที่ความเข้มแสง 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (หลอดแอลอีดีสปอตไลท์) โดยให้แสงเป็นเวลา 0, 16 หรือ 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 24 วัน ทำการบันทึกผลการทดลองเป็นจำนวนฟรอนด์และเปอร์เซ็นต์การออกดอก (Cleland and Briggs, 1967)

2.3. การชักนำให้เกิดแคลลัสในแหนเล็ก

2.3.1. การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS pH 5.8 ที่มีการเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 2, 3, 4 และ 5 μM จากนั้นนำมาแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 50 ขวด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.3.2. การเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัส

คัดเลือกแหนเล็กปลอดเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E เป็นเวลา 14 วัน มา 2 ประเภท คือ แหนเล็กที่มีฟรอนด์และรากสมบูรณ์ และแหนเล็กที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลโดยใช้ใบมีดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) ความเข้มข้นร้อยละ 0.18 (3% Haiter®) เป็นเวลา

3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที จากนั้นย้ายชิ้นส่วนทั้ง 2 ประเภทลงในอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 3-5 ฟรอนด์ ทำการเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสงประมาณ 55 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ตรวจสอบการเกิดแคลลัสพร้อมบันทึกภาพทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน นำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E ที่ไม่มีน้ำตาล เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์จนเกิดการแตกฟรอนด์ใหม่

2.4. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

2.4.1. การเตรียมอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV-303

เขี่ยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* GV-303 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ซึ่งมียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าที่ 200 rpm ข้ามคืน จากนั้นถ่ายอะโกรแบคทีเรียลงในอาหาร LB ใหม่ ซึ่งมียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ในช่วง 0.6 -0.8 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 20 mM บนน้ำแข็ง

2.4.2. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

เติมพลาสมิด pB7WG หรือ pBWG2D ลงไปในเซลล์แขวนลอยแช่เย็นที่เตรียมไว้ร้อยละ 10 โดยปริมาตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 2 นาที และนำไปวางบนน้ำแข็งต่อ 30 นาที จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 µg/ml และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

2.4.3. การเจริญเติบโตของอะโกรแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ ceftriaxone

เลี้ยงอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pB7WG หรือ pBWG2D ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 µg/ml ข้ามคืน จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% ลงในอาหารใหม่ที่มี ยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ ceftriaxone ความเข้มข้น 0, 50, 100, 250, 500 หรือ 1,000 µg/ml โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ทุก 6 ชั่วโมง

2.5. การแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

2.5.1. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียน

เลี้ยงแหนใหญ่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้จำนวนฟรอนด์เริ่มต้น 15-20 ฟรอนด์ ที่ความเข้มแสง 55 μmol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25^{o}C เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำทิวเรียนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Hoagland's E เป็นระยะเวลา 14 วัน ที่สภาวะเดียวกัน บันทึกการเจริญเติบโต

2.5.2. การหาความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชในแหน

เพาะเลี้ยงแหนใหญ่หรือทิวเรียนในอาหาร MS หรือ Hoagland's E ที่มีสารปราบวัชพืช Glufosinate ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 0.10 และ 0.50 mM โดยใช้จำนวนฟรอนด์เริ่มต้น 5-7 ฟรอนด์ ที่ความเข้มแสง 55 μmol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25^{o}C เป็นระยะเวลา 14 วัน บันทึกการเจริญเติบโต

2.5.3. การเตรียมอะโกรแบคทีเรียเพื่อถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชและโปรตีนเรืองแสงเข้าสู่แหน

เขี่ยเชื้อ *A. tumefaciens* GV-303 ที่ได้รับพลาสมิด pB7WG ลงบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 μg/ml และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นลงเชื้ออะโกรแบคทีเรียในอาหาร YEM ที่เติมยาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 μg/ml spectinomycin ความเข้มข้น 200 μg/ml และสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 μM โดยเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นถ่ายอะโกรแบคทีเรียลงในอาหาร YEM ใหม่ ในอัตราส่วนร้อยละ 5 และเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง 12-15 ชั่วโมง จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ประมาณ 2 (ดัดแปลงมาจาก Yamamoto et al, 2001)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์ไปละลายในอาหาร MS pH 5.84 ซึ่งประกอบไปด้วย น้ำตาลซูโครส 1% สารลดแรงตึงผิว tween-80 0.2% และสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 μM จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ประมาณ 0.4 – 0.5

2.5.4. การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชและโปรตีนเรืองแสงเข้าสู่ทิวเรียน

กำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนทิวเรียนด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) ความเข้มข้นร้อยละ 0.18 (3% Haiter®) เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที จากนั้นย้ายทิวเรียนลงไปแช่ในอะโกรแบคทีเรียที่แขวนลอยในอาหาร MS และนำไปดูดอากาศออกโดยใช้ปั๊มสูญญากาศเป็นระยะเวลา 0, 5, 10 หรือ 20 นาที จากนั้นนำออกมาพักไว้ด้านนอก 30 นาที โดยวางบนกระดาษกรองเพื่อซับสารละลายส่วนเกินออก และย้ายลงไปวางบนกระดาษกรองที่ชุ่มไปด้วยอาหาร MS ซึ่งประกอบไปด้วย

น้ำตาลซูโครส 1% และสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 µM โดยทำการเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับทิวเรียนเป็นระยะเวลา 3 วัน ที่ความเข้มแสง 55 µmol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25^{o}C จากนั้นนำทิวเรียนไปล้างด้วยยาปฏิชีวนะ ceftriaxone ความเข้มข้น 500 µg/ml 4 – 5 รอบ วางบนกระดาษกรองเพื่อซับสารละลายส่วนเกินออก และย้ายไปสู่อาหาร MS1 (1% sucrose) MS2 (1% sucrose, 100 µM acetosyringone หรือ 250 µg/ml ceftriaxone) MS3 (1% sucrose, 100 µM acetosyringone, 250 µg/ml ceftriaxone และ 0.01 mM Glufosinate) เป็นระยะเวลา 14 วัน

2.5.5. การตรวจสอบแหนใหญ่ที่ถูกแปลงสภาพ

นำแหนมาบดในสารละลาย Edward's buffer (Edward et al., 1991) 3 ml นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm 10 นาที เทส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75% รอให้ตะกอนแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ไปใช้เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase (PL1204, Vivantis) และไพร์เมอร์ *Bar* (Forward: 5'-GACAAGCACGGTCAACTTCC-3'; Reverse: 5'-ACCCACGTCATGCCAGTT-3') *GFP* (Forward: 5'-GACGTAAACGGCCACAAGTT-3; Reverse: 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGT-3') และ *Actin*SP (Forward: 5-'CAGGTATTGTGCTGGATTCTGG-3'; Reverse: 5'-TGTAGGTCGTCTCGTGGATG-3') ใช้รอบ PCR ดังต่อไปนี้ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ทั้งหมด 40 รอบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไปตรวจสอบขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.6. การติดตามการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงโดยการควบคุมของ *35S promoter*

นำแหนใหญ่ที่ผ่านกระบวนการแปลงสภาพที่ระยะเวลานำอากาศออก 0, 5, 10 และ 20 นาที มาถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์เพื่อเปรียบเทียบการเรืองแสงสีเขียวเมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้า กับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านกระบวนการแปลงสภาพ โดยแหนที่มีการผลิตโปรตีนเรืองแสง (GFP) จะเห็นเป็นสีส้มภายใต้การกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้าเนื่องจากเกิดการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ซึ่งให้สีแดงพร้อมกัน

2.7. การทดสอบแหนที่ผ่านการแปลงสภาพในห้องทดลอง

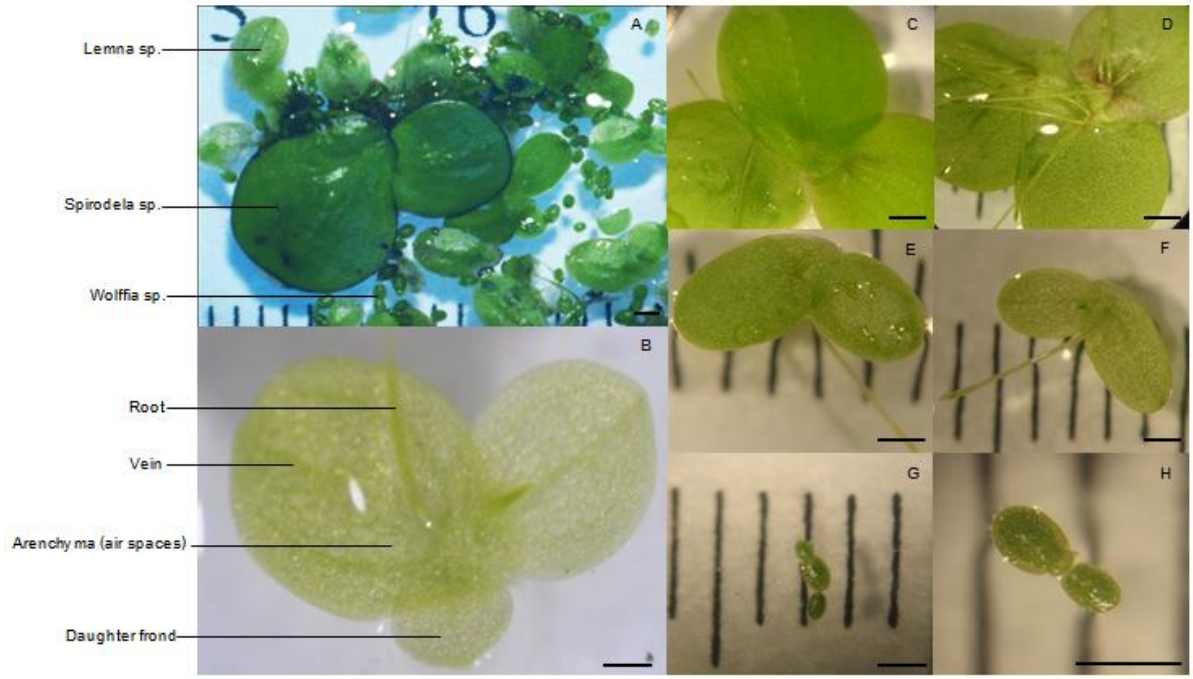
นำแหนใหญ่ที่ผ่านกระบวนการแปลงสภาพมาทำการทดสอบความเสถียรของยีนที่ส่งถ่ายไปยังแหนดังกล่าว โดยนำแหนใหญ่ที่มีการแสดงออกของยีน *Bar* และ *Egfp* มาทำการเพาะเลี้ยงต่อในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารปราบวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้น 0, 0.005 และ 0.01 mM นาน 20 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตของแหนใหญ่ และนำแหนใหญ่ที่เจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวมาสกัดสารพันธุกรรมและทดสอบการคงอยู่ของยีน *Bar* และ *Egfp* โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

3. ผลการวิจัย

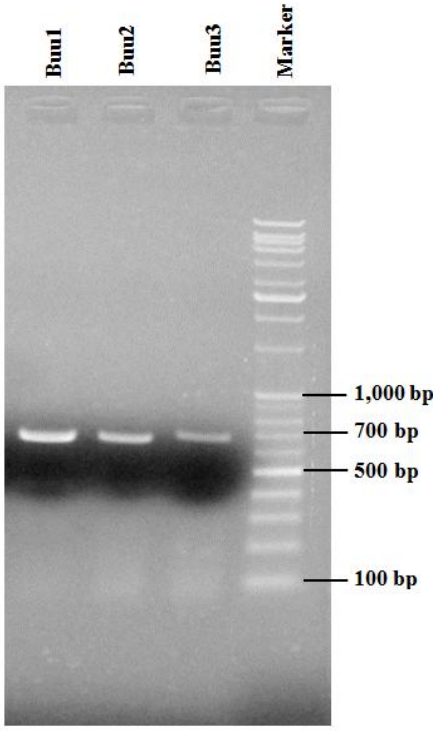
3.1. การจำแนกสายพันธุ์แหนด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากการเก็บตัวอย่างแหนจากแหล่งน้ำบริเวณโรงเรียนสาธิตพิบูลบำเพ็ญ มหาวิทยาลัยบูรพา พบแหน 3 ชนิด ได้แก่ แหนใหญ่ (*Spiodela sp.*) แหนเล็ก (*Lemna sp.*) และไข่น้ำ (*Wolffia sp.*) ดังแสดงในภาพที่ 1A โดยโครงสร้างหลักของแหนจะประกอบด้วยฟรอนด์แม่ ฟรอนด์ลูก เส้นกลางใบ (vein) และช่องอากาศ (arenchama) จำนวนมากที่ช่วยให้แหนสามารถลอยอยู่บนผิวน้ำได้ (ภาพที่ 1B) โดยแหนใหญ่มีขนาดประมาณ 10 mm และมีเส้นกลางใบประมาณ 7-8 เส้น เมื่อสังเกตใต้ท้องใบพบรากจำนวนมาก ประมาณ 5-12 ราก (ภาพที่ 1C และ 1D) ส่วนแหนเล็กมีขนาด 2-3 mm เส้นกลางใบประมาณ 2-3 เส้น ใต้ท้องใบมีรากเพียง 1-2 ราก (1E และ 1F) ในขณะที่ไข่น้ำมีขนาดเล็กกว่า 1 mm และไม่พบราก (1G และ 1H)

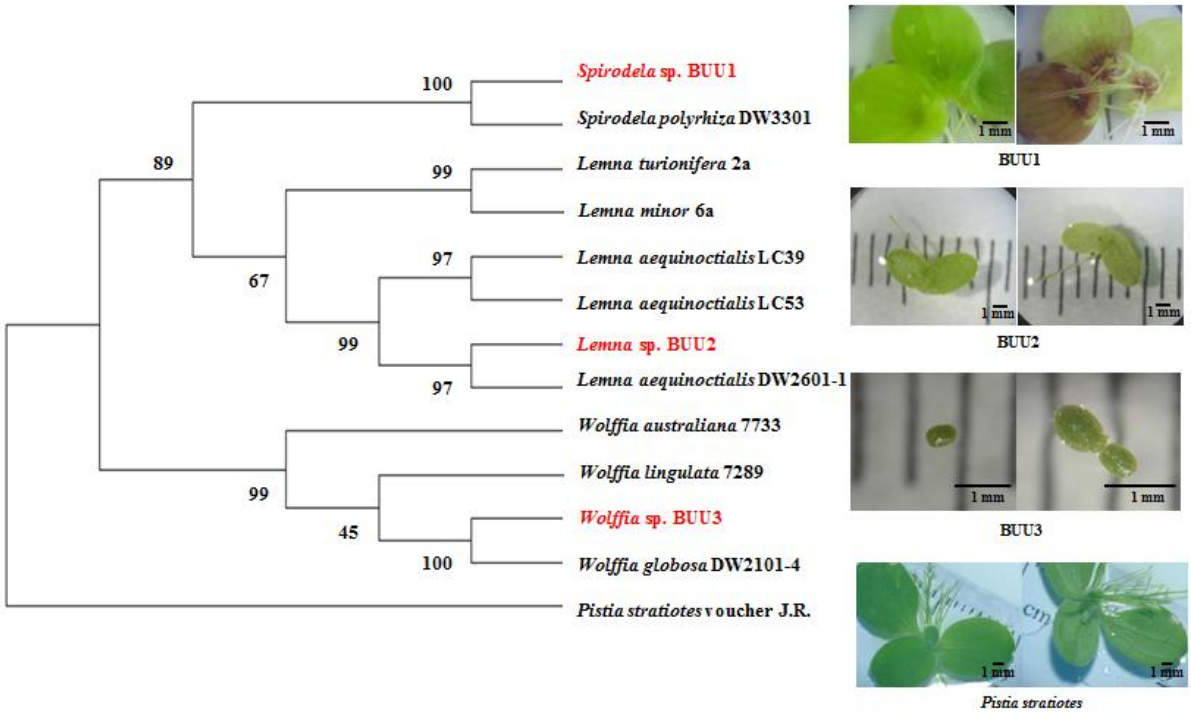
เมื่อนำแหนแต่ละชนิดมากำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน สกัดสารพันธุกรรม และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ *atpF-atpH*) พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้แม่พิมพ์จากแหนใหญ่ แหนเล็ก และไข่น้ำ มีขนาดประมาณ 700 bp (ภาพที่ 2) เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum likelihood โดยโปรแกรม MEGA 6 ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ (ภาพที่ 3) ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างแหนได้ 3 กลุ่ม ใหญ่ ๆ คือ แหนใหญ่ (*Spiodela*) แหนเล็ก (*Lemna*) และไข่น้ำ (*Wolffia*) โดยใช้จอก (*Pistia stratiotes* voucher J.R) เป็น outgroup ซึ่งตัวอย่างแหนใหญ่ *Spirodela Sp.* BUU1 สามารถระบุชนิดได้เป็น *Spirodela polyrhiza* ตัวอย่างแหนเล็ก *Lemna Sp.* BUU2 สามารถระบุชนิดได้เป็น *Lemna aequinoctialis* และตัวอย่างไข่น้ำ *Wolffia Sp.* BUU3 สามารถระบุชนิดได้เป็น *Wolffia globosa* ที่ค่าความเชื่อมั่น 100%, 97%, และ 100% ตามลำดับ



ภาพที่ 1. ลักษณะทางกายวิภาคของแหนที่เก็บได้จากแหล่งน้ำบริเวณโรงเรียนสาธิตพิบูลบำเพ็ญ มหาวิทยาลัยบูรพา A) แหนที่เก็บได้จากแหล่งน้ำบริเวณโรงเรียนสาธิตพิบูลบำเพ็ญ B) โครงสร้างหลักของแหน C, D) แหนใหญ่ E, F) แหนเล็ก G, H) ไข่น้ำ (scale = 1 mm)



ภาพที่ 2. ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้แม่พิมพ์จากแหนใหญ่ (BUU1) แหนเล็ก (BUU2) และไข่น้ำ (BUU3) โดยใช้ไพร์เมอร์ *atpF-atpH*



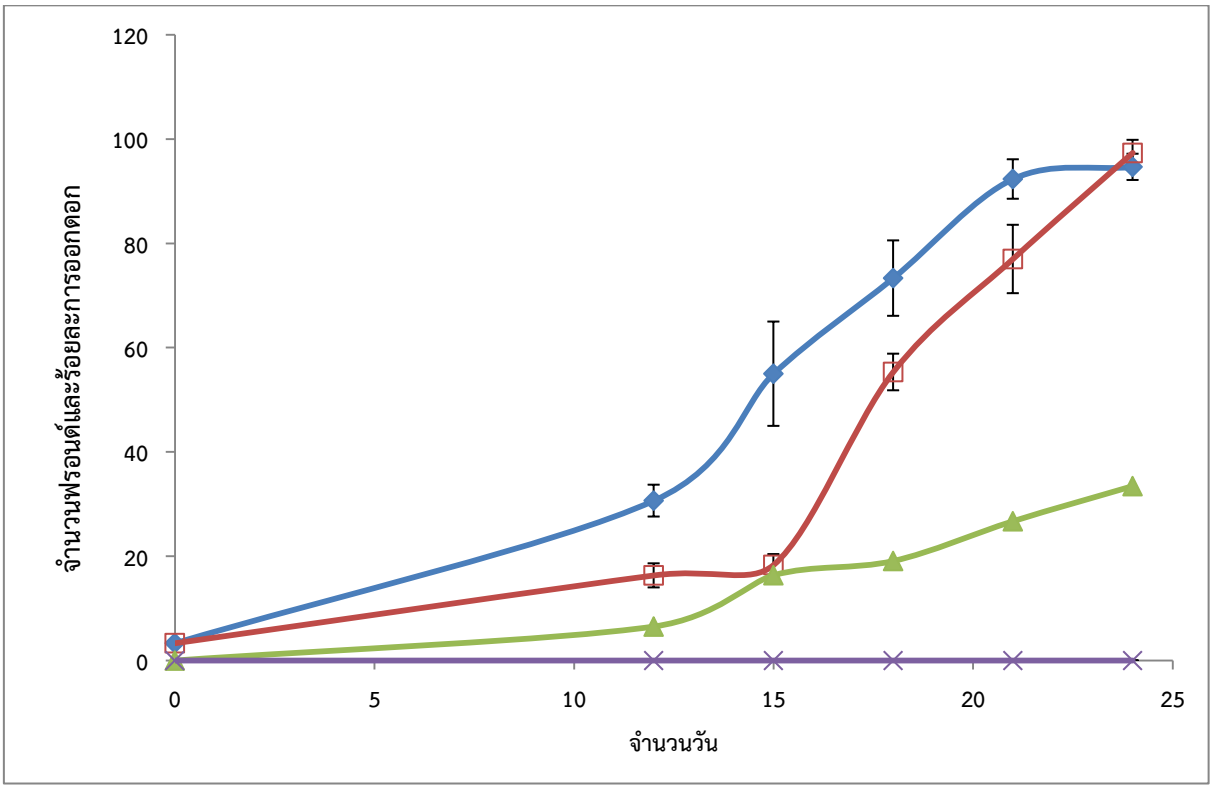
ภาพที่ 3. แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตัวอย่างแหนใหญ่ *Spirodela Sp.* BUU1, *Lemna Sp.* BUU2 และ *Wolffia Sp.* BUU3 ที่พบภายในแหล่งน้ำของโรงเรียนสาธิตพิบูลบำเพ็ญ มหาวิทยาลัยบูรพาเทียบกับสายพันธุ์อื่นในวงศ์ *Lemnaceae* ด้วยวิธี maximum likelihood โดยโปรแกรม MEGA 6

3.2. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอก

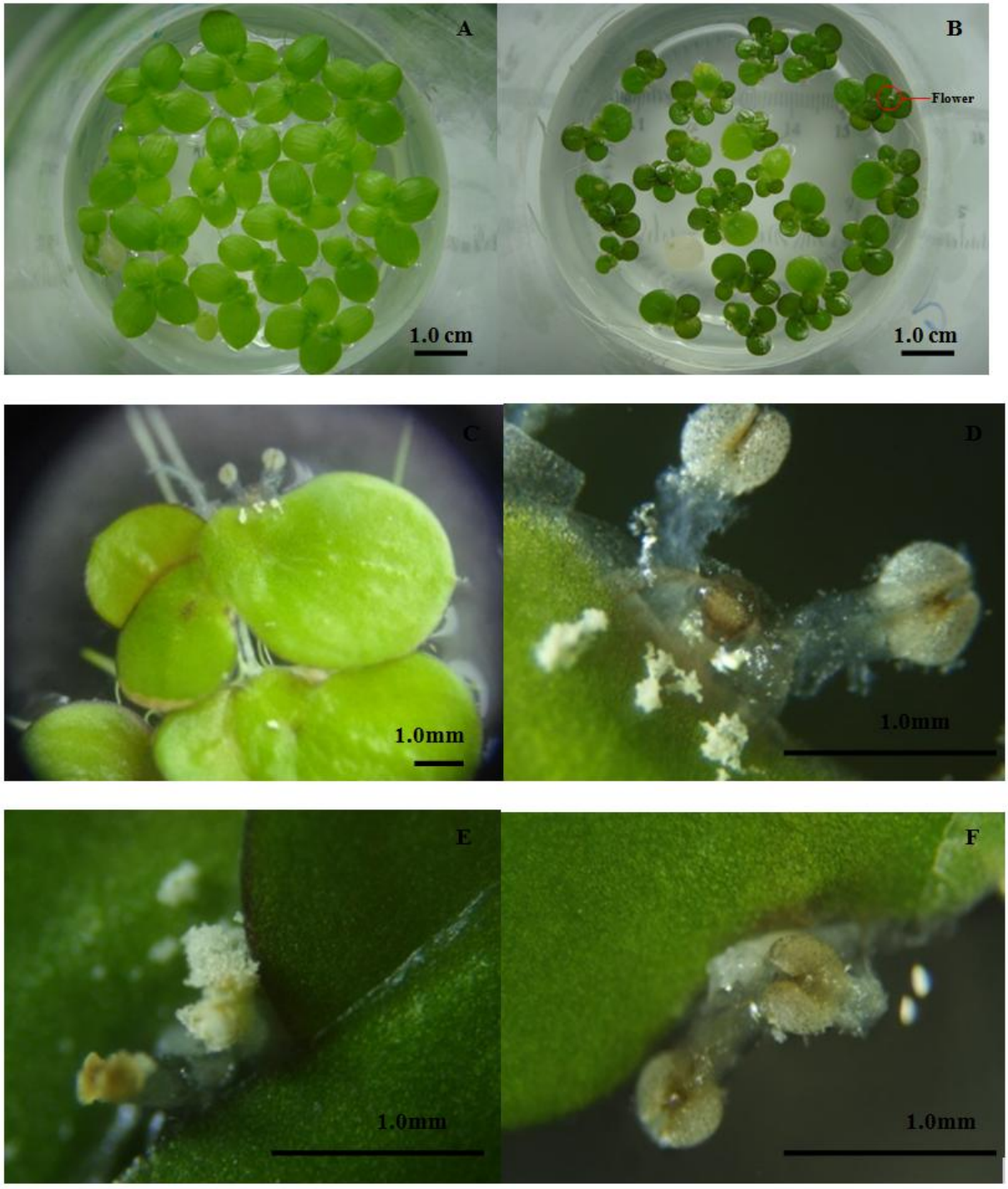
เนื่องจากแหนเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดในโลก การศึกษาการออกดอกของแหนจะช่วยให้เกิดการพัฒนาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์และการแปลงสภาพแหนด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาหาสภาวะที่ส่งผลให้แหนออกดอก โดยพบว่าแหนใหญ่สามารถเหนี่ยวนำให้ออกดอกได้ร้อยละ 33.45 เมื่อเหนี่ยวนำด้วยกรดซาลิไซลิก (SA) ที่ความเข้มข้น 3 μM ที่ความเข้มแสง 100 μmol.m^{-2}.s^{-1} โดยให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของแหนใหญ่พบว่า แหนที่ได้รับ SA ที่ความเข้มข้น 3 μM จะเจริญเติบโตได้เร็วกว่าชุดควบคุมในระยะแรก และการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเริ่มออกดอก (ภาพที่ 4) โดยมีลักษณะของฟรอนด์เล็กลงและหนาขึ้น ประกอบกับการเพิ่มขึ้นของรงควัตถุสีม่วงใต้ใบ โดยจะพบดอกบริเวณด้านแคบของฟรอนด์ใกล้กับกระเปาะที่เกิดราก และมีลักษณะของดอกแยกเพศโดยมีก้านชูดอกตัวผู้ 2 ก้าน และมีดอกตัวเมียอยู่ติดขอบฟรอนด์ด้านล่างระหว่างเกสรตัวผู้ ซึ่งจะพัฒนาเป็นเมล็ดเมื่อปฏิสนธิ (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 ผลของแสงและกรดซาลิไซลิกต่อการออกดอกของแหนใหญ่

การให้แสงต่อวัน		ร้อยละการออกดอก			
		ชุดควบคุม	1μM SA	3 μM SA	5μM SA
30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	0 ชั่วโมง	0	0	0	0
	16 ชั่วโมง	0	0	0	0
	24 ชั่วโมง	0	0	2.47	0
100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$	0 ชั่วโมง	0	0	0	0
	16 ชั่วโมง	0	0	21.86	0
	24 ชั่วโมง	0	0	33.45	7.65



ภาพที่ 4. การเจริญเติบโตและการออกดอกของแหนใหญ่ เส้นสีแดง (สี่เหลี่ยม) และสีฟ้า (หลามตัด) แสดงจำนวนฟรอนด์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มี SA 3 μM ตามลำดับ เส้นสีม่วง (กากบาท) และสีเขียว (สามเหลี่ยม) แสดงร้อยละการออกดอกของแหนในชุดควบคุม และชุดที่เติม SA 3 μM ตามลำดับ เมื่อให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 100 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$



ภาพที่ 5. การออกดอกของแหนใหญ่เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยกรดซาลิไซลิกในอาหาร Hoagland's E ที่ ความเข้มแสง 100 μmol.m^{-2}.s^{-1} 24 ชั่วโมงต่อวัน A) ชุดควบคุม B) แหนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย SA 3 μM C) บริเวณของฟรอนด์ที่แหนออกดอก D-F) ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกแหน

3.3. การชักนำให้เกิดแคลลัสในแหนเล็ก

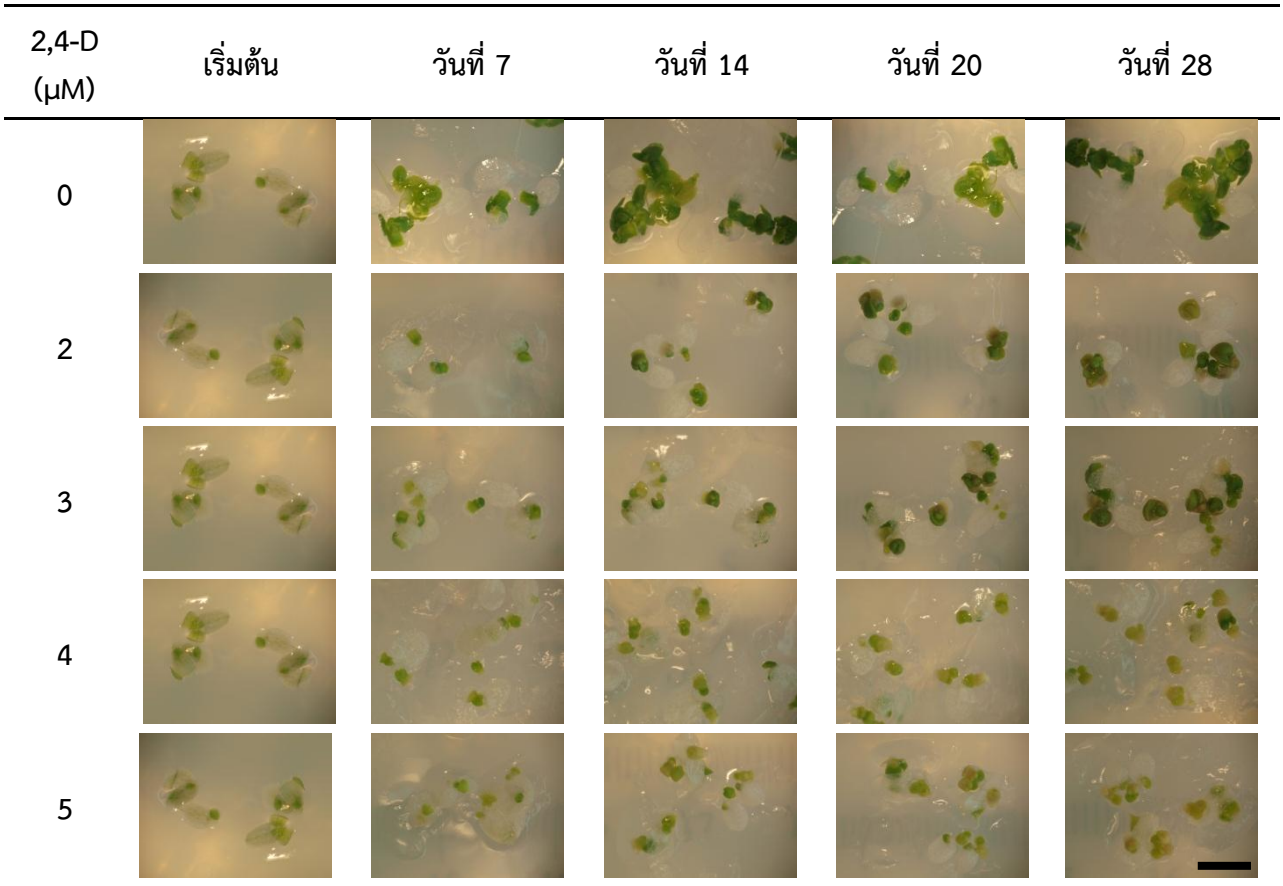
เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแหนเล็กที่มีฟรอนด์และรากสมบูรณ์ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ 2, 3 4, และ 5 µM สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ที่ 90, 100, 90, และ 100% ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนแหนเล็กที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ที่ 100, 100, 95, และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ในขณะที่แหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมสาร 2,4-D พบการแตกฟรอนด์ใหม่ที่ 100% ในวันที่ 7 (ตารางที่ 3) โดยสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 หรือ 3 µM สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว ในขณะที่สาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 4 หรือ 5 µM ชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยและมีลักษณะกลุ่มก้อนที่เกิดเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 6 และ 7) เมื่อย้ายแคลลัสอายุ 20 วัน (ภาพที่ 8A) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E ที่ไม่มีน้ำตาล ที่ห้องควบคุมสภาวะอุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ความเข้มแสงประมาณ 55 µmol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันพบว่าแคลลัสเริ่มเกิดเป็นฟรอนด์เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2-3 สัปดาห์ (ภาพที่ 8C) และเมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์ จะเกิดสร้างสร้างฟรอนด์ที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 8D)

ตารางที่ 2 ร้อยละการเกิดแคลลัสของแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่มีสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 2, 3, 4 และ 5 µM (n=20)

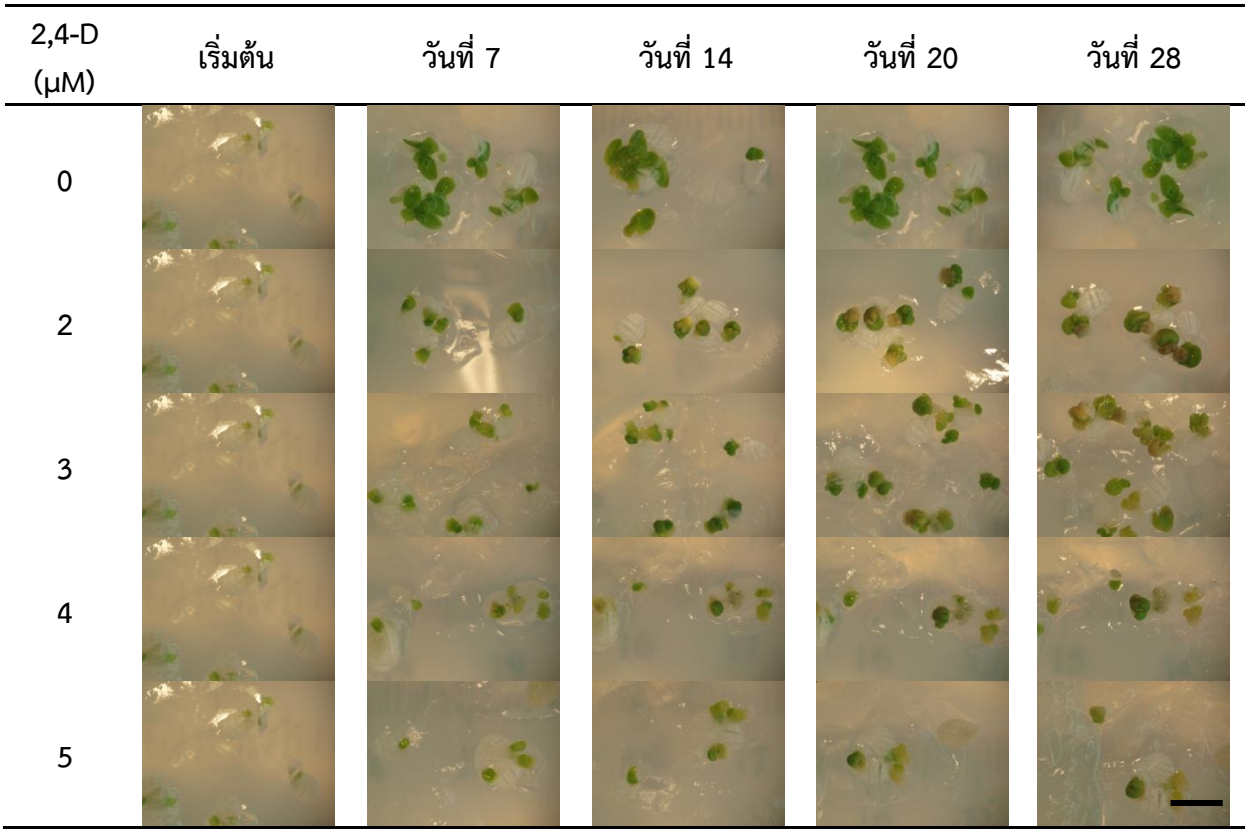
2,4-D (µM)	% การเกิดแคลลัส									
	ชักนำฟรอนด์ที่สมบูรณ์ (วัน)					ชักนำฟรอนด์ที่ทำให้เกิดบาดแผล (วัน)				
	0	7	14	20	28	0	7	14	20	28
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	100	90	90	90	0	100	100	100	100
3	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100
4	0	100	90	90	90	0	95	95	95	95
5	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100

ตารางที่ 3 ร้อยละการเกิดฟรอนด์ของแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่มีสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 2, 3, 4 และ 5 µM (n=20)

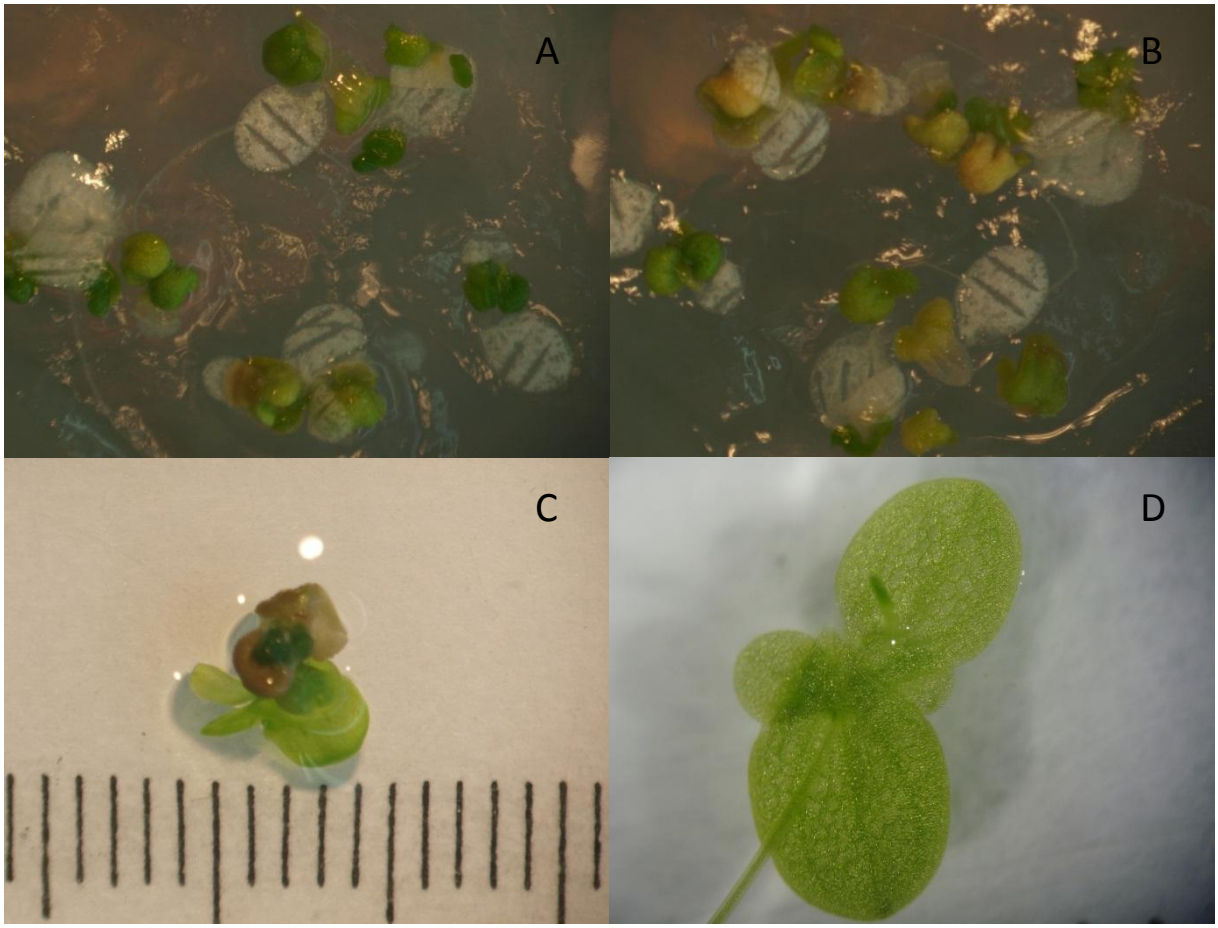
2,4-D (µM)	% การเกิดฟรอนด์									
	ชักนำฟรอนด์ที่สมบูรณ์ (วัน)					ชักนำฟรอนด์ที่ทำให้เกิดบาดแผล (วัน)				
	0	7	14	20	28	0	7	14	20	28
0	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



ภาพที่ 6 การเกิดแคลลัสของแหนเล็กโดยการชักนำฟรอนด์ที่สมบูรณ์ในอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่มีสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 2, 3, 4 และ 5 µM ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 µ.mol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 28 วัน (scale bar = 0.5 cm)



ภาพที่ 7 การเกิดแคลลัสของแหนเล็กโดยการชักนำฟรอนด์ให้เกิดบาดแผลในอาหารกึ่งแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่มีสาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 2, 3, 4 และ 5 μM ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 28 วัน (scale bar = 0.5 cm)



ภาพที่ 8 การพัฒนาแคลลัสเป็นฟรอนด์ที่สมบูรณ์ของแหนเล็กที่เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C ที่ความเข้มแสงประมาณ 55 µ.mol.m^{-2}.s^{-1} เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

A) กลุ่มก้อนแคลลัสสีเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสาร 2,4-D ความเข้มข้น 3 µM อายุ 20 วัน

B) กลุ่มก้อนแคลลัสสีเหลืองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสาร 2,4-D ความเข้มข้น 3 µM อายุ 28 วัน

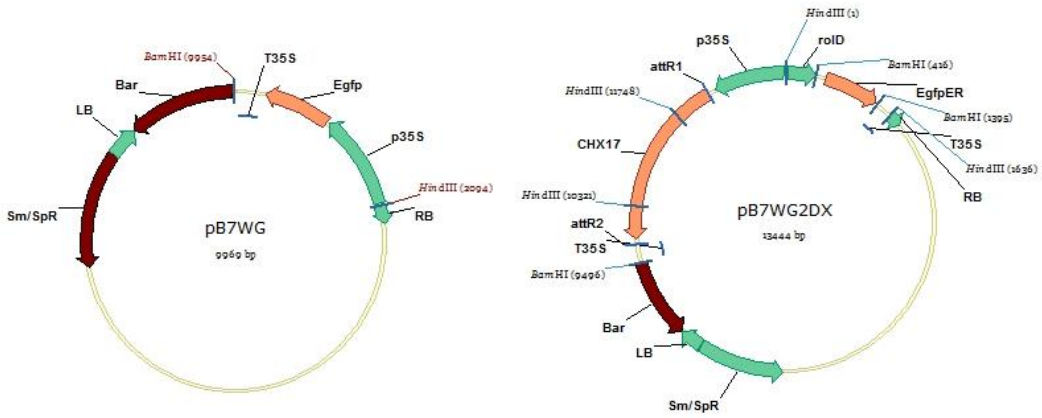
C) แคลลัสที่เริ่มเกิดการแตกฟรอนด์ใหม่ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E ที่ไม่มีน้ำตาลนาน 2-3 สัปดาห์

D) ฟรอนด์ที่สมบูรณ์ที่ได้จากแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 4-5 สัปดาห์ในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E ไม่มีน้ำตาล

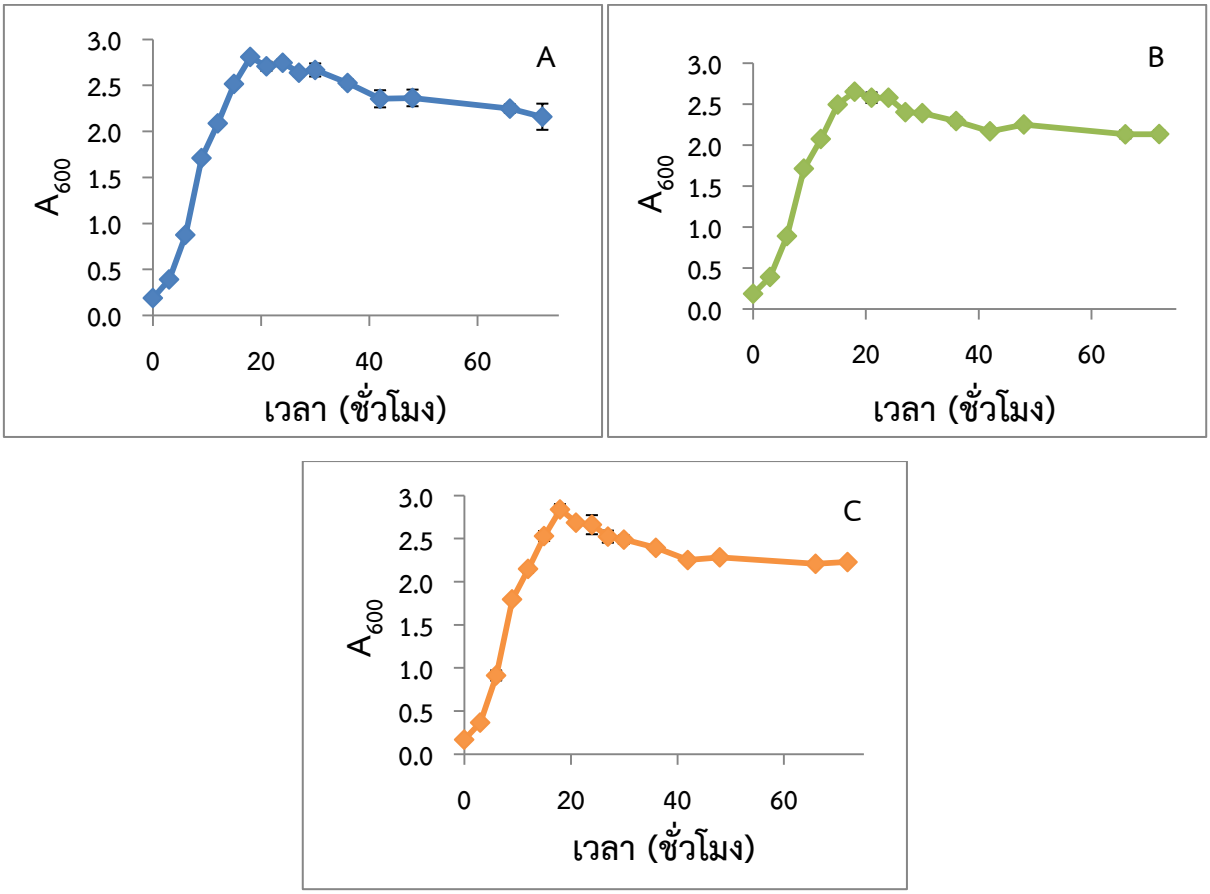
3.4. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

พลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียเป็นไบนารีเวคเตอร์สำหรับถ่ายยีนต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate (*Bar*) และยีนโปรตีนเรืองแสง (*Egfp*) เข้าสู่แหน โดยใช้ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ spectinomycin เป็นตัวคัดเลือกในอะโกรแบคทีเรีย (*Sm/SpR*) (ภาพที่ 9) โดยอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดทั้งสองชนิดมีลักษณะการเจริญเติบโตในอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ spectinomycin ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ไม่แตกต่างจากอะโกรแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปกติ (ภาพที่ 10)

เนื่องจากในกระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่แหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะต้องกำจัดอะโกรแบคทีเรียทิ้งเพื่อไม่ให้รบกวนการเจริญเติบโตของแหน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ ceftriaxone ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ ceftriaxone ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pB7WG และ pB7WG2DX คือมากกว่า 100 µg/ml ขึ้นไป (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 9 โครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นไบนารีเวคเตอร์สำหรับถ่ายยีนต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate (*Bar*) และยีนโปรตีนเรืองแสง (*Egfp*) เข้าสู่แหน

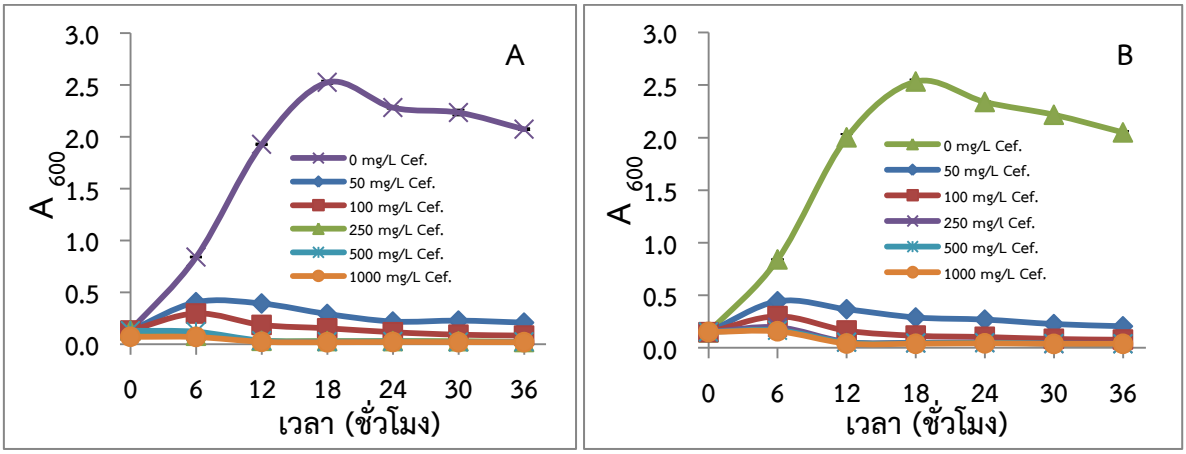


ภาพที่ 10 การเจริญเติบโตของอะโกรแบคทีเรีย (*A. tumefaciens* GV-303) ในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ spectinomycin ความเข้มข้น 200 µg/ml (ในกรณีที่ระบุ)

A) อะโกรแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการแปลงสภาพ

B) อะโกรแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการแปลงสภาพด้วยพลาสมิด pB7WG และเติม spectinomycin

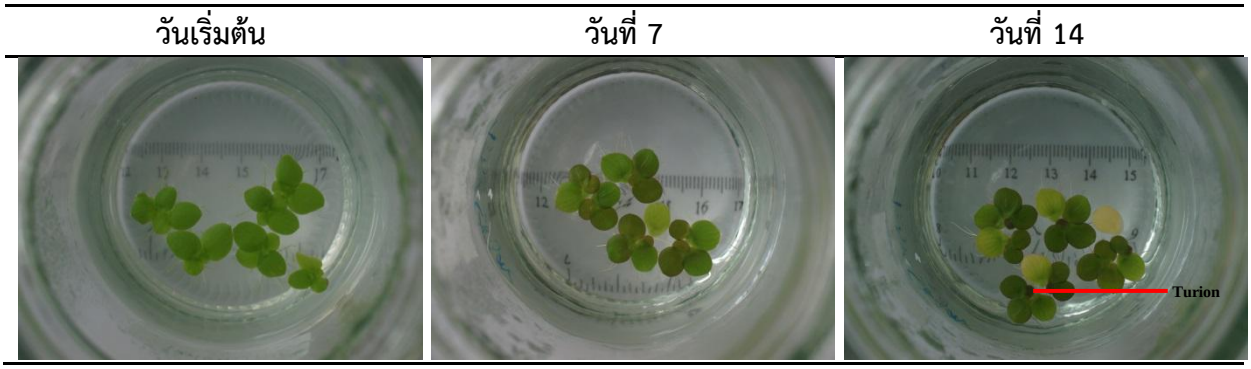
C) อะโกรแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการแปลงสภาพด้วยพลาสมิด pB7WG2DX และเติม spectinomycin



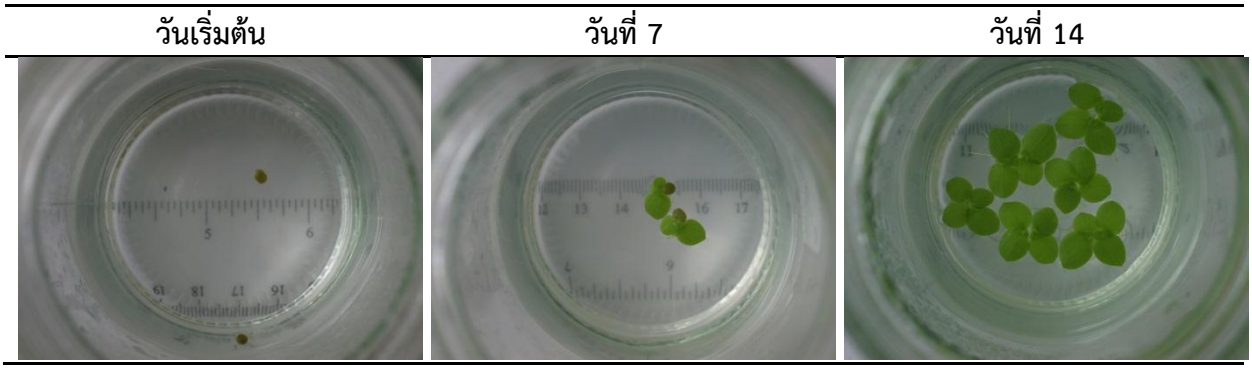
ภาพที่ 11 การเจริญเติบโตของอะโกรแบคทีเรีย (*A. tumefaciens* GV-303) ในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml spectinomycin ความเข้มข้น 200 µg/ml และ ceftriaxone โดย A) อะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pB7WG และ **B**) อะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pB7WG2DX

3.5. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียน

ทิวเรียน (turion) เป็นฟรอนด์รูปแบบหนึ่งของแหนซึ่งจะถูกสร้างขึ้นมาเมื่อมีสภาวะไม่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบการสร้างทิวเรียนด้วยการเหนี่ยวนำด้วยน้ำกลั่น โดยพบว่าเมื่อนำแหนใหญ่มาเลี้ยงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ฟรอนด์ของแหนใหญ่เริ่มมีสีเหลืองในวันที่ 7 ของการเลี้ยง และเกิดเป็นทิวเรียนในวันที่ 14 ของการเลี้ยง โดยทิวเรียนจะแตกออกมาจากฟรอนด์แม่มีลักษณะเป็นก้อนกลม สีดำ และจะหลุดร่วงจมลงไปก้นขวดเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 12) เมื่อนำทิวเรียนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland's E พบว่าทิวเรียนมีการแตกเป็นฟรอนด์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มจำนวนฟรอนด์มากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 14 วัน (ภาพที่ 13)



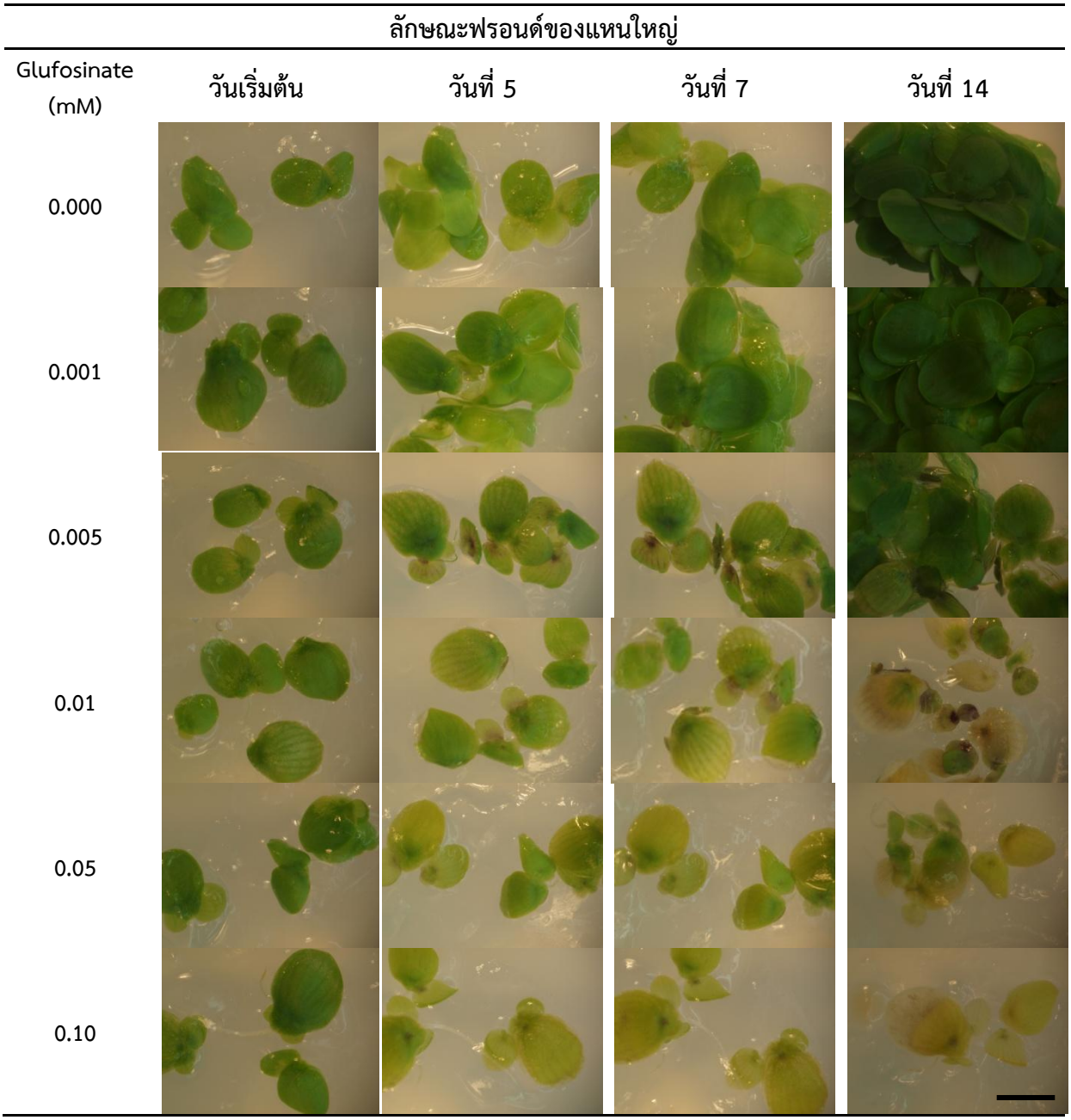
ภาพที่ 12 การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียนโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อภายในระยะเวลา 14 วัน ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 µ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน



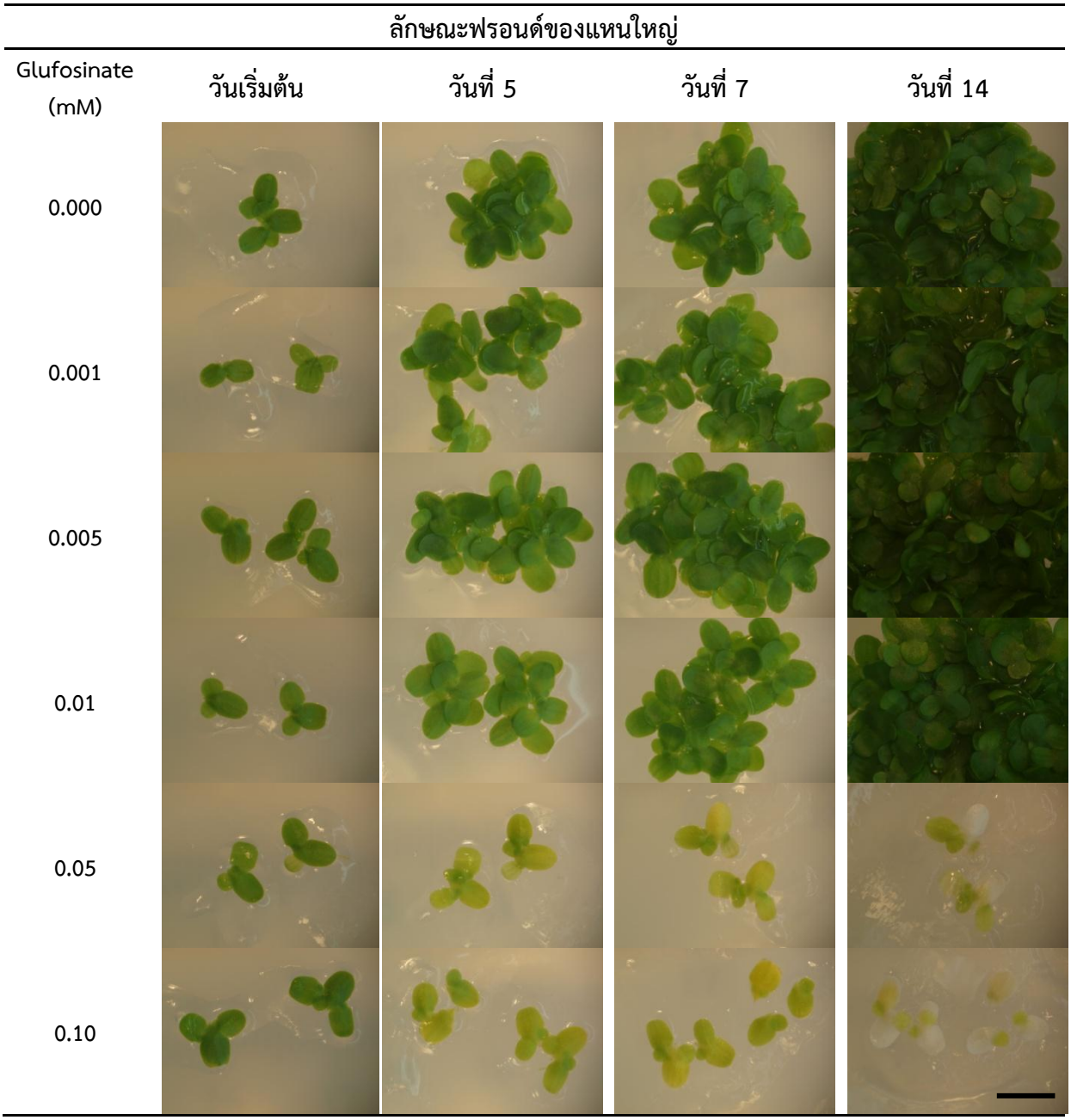
ภาพที่ 13 การงอกของฟรอนด์ใหม่จากทิวเรียนของแหนใหญ่เมื่อได้รับอาหาร Hoagland's E เป็นระยะเวลา 14 วัน ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.6. การหาความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืช glufosinate ในแหน

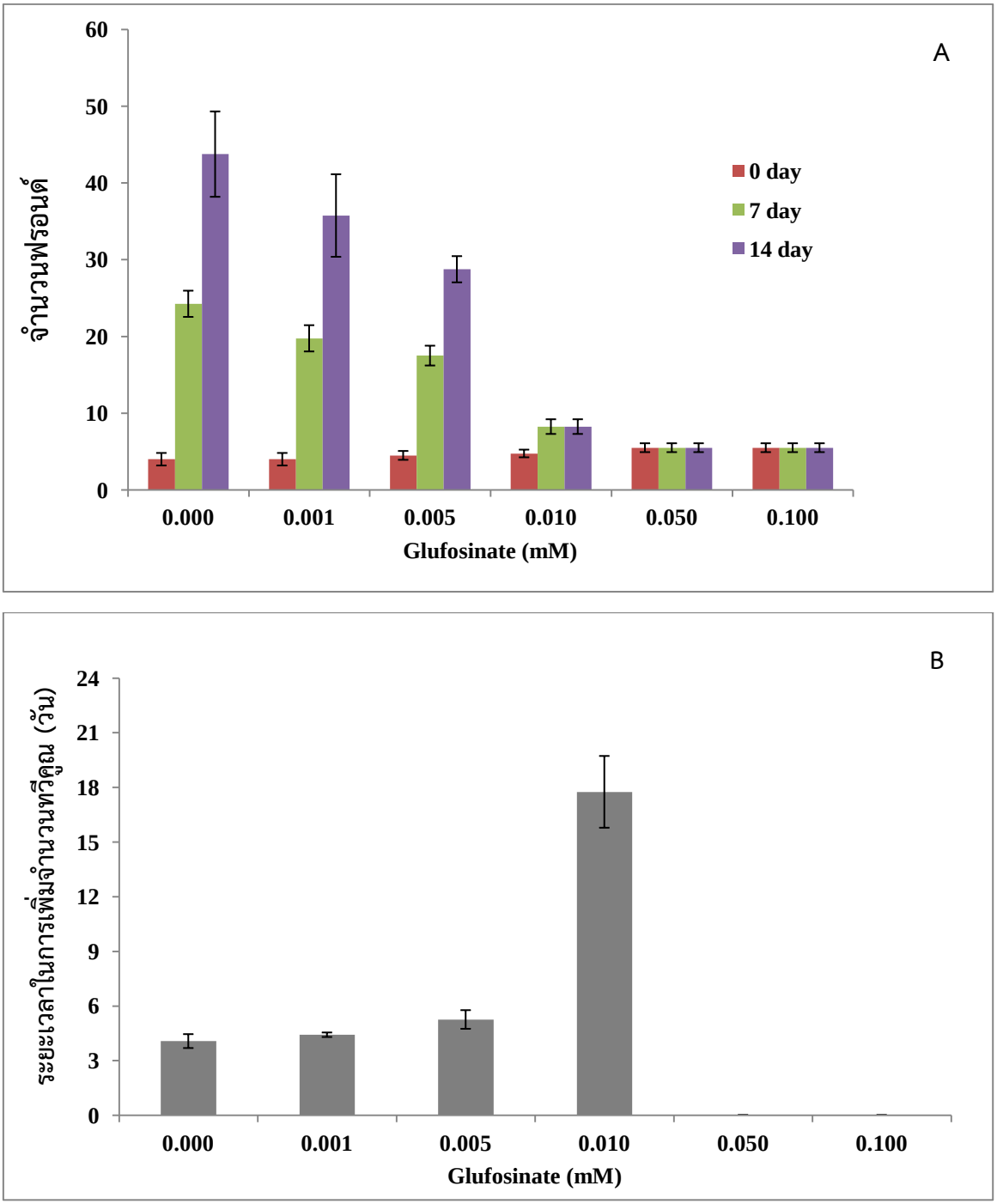
เนื่องจากการคัดเลือกแหนที่ถูกแปลงสภาพผู้วิจัยใช้การต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate โดยอาศัยยีน *Bar* ที่แหนได้รับผ่านทางอะโกรแบคทีเรียเป็นตัวคัดเลือก ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปราบวัชพืช glufosinate ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน โดยนำแหนใหญ่ และแหนเล็ก มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (0.4% agar) ที่เติมสารปราบวัชพืช glufosinateที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 14 และ 15) พบว่าการเติมสาร glufosinateที่ความเข้มข้น 0.01 mM ส่งผลให้แหนใหญ่มีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเท่าทวีคูณเท่ากับ 17.75±1.97วัน แหนเล็ก มีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเท่าทวีคูณเท่ากับ 2.66±0.06 วัน ในขณะที่สารปราบวัชพืช glufosinateที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 mM ส่งผลให้แหนใหญ่ และแหนเล็กหยุดการเจริญเติบโต (ภาพที่ 16 และ 17) นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองในอาหารเหลว Hoagland's E พบว่าสารปราบวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้น 0.01mM ส่งผลให้แหนใหญ่และแหนเล็กมีระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเท่าทวีคูณเท่ากับ 6.99±0.28 และ 6.03±0.15 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 20 และ 21) ในขณะที่สารปราบวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.50 1.00 และ 5.00 mM ส่งผลให้แหนใหญ่ และแหนเล็กหยุดการเจริญเติบโต (ภาพที่ 18 และ 19)



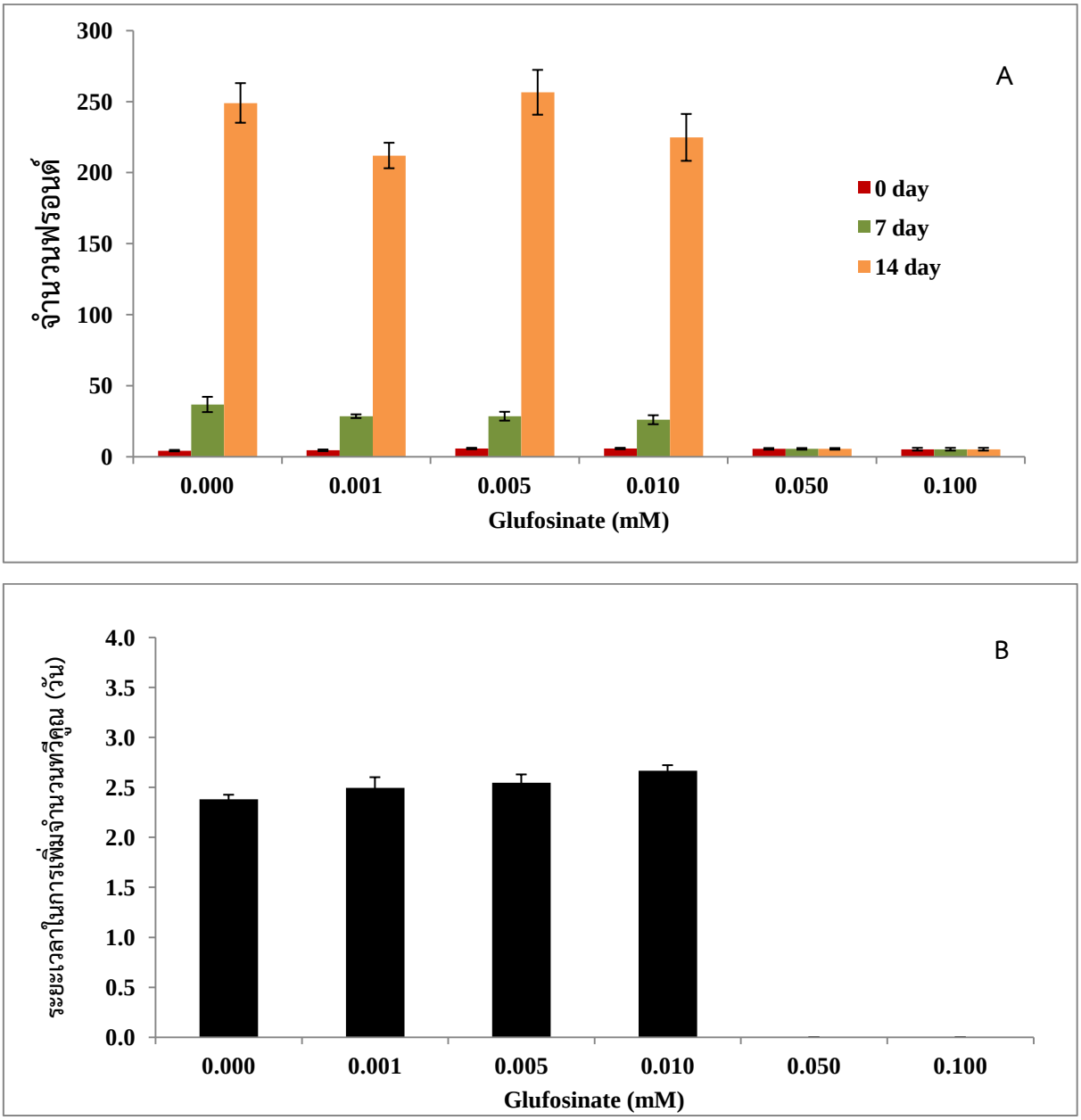
ภาพที่ 14 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนใหญ่โดยสารปราบวัชพืช glufosinate บนอาหารแข็ง MS ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน



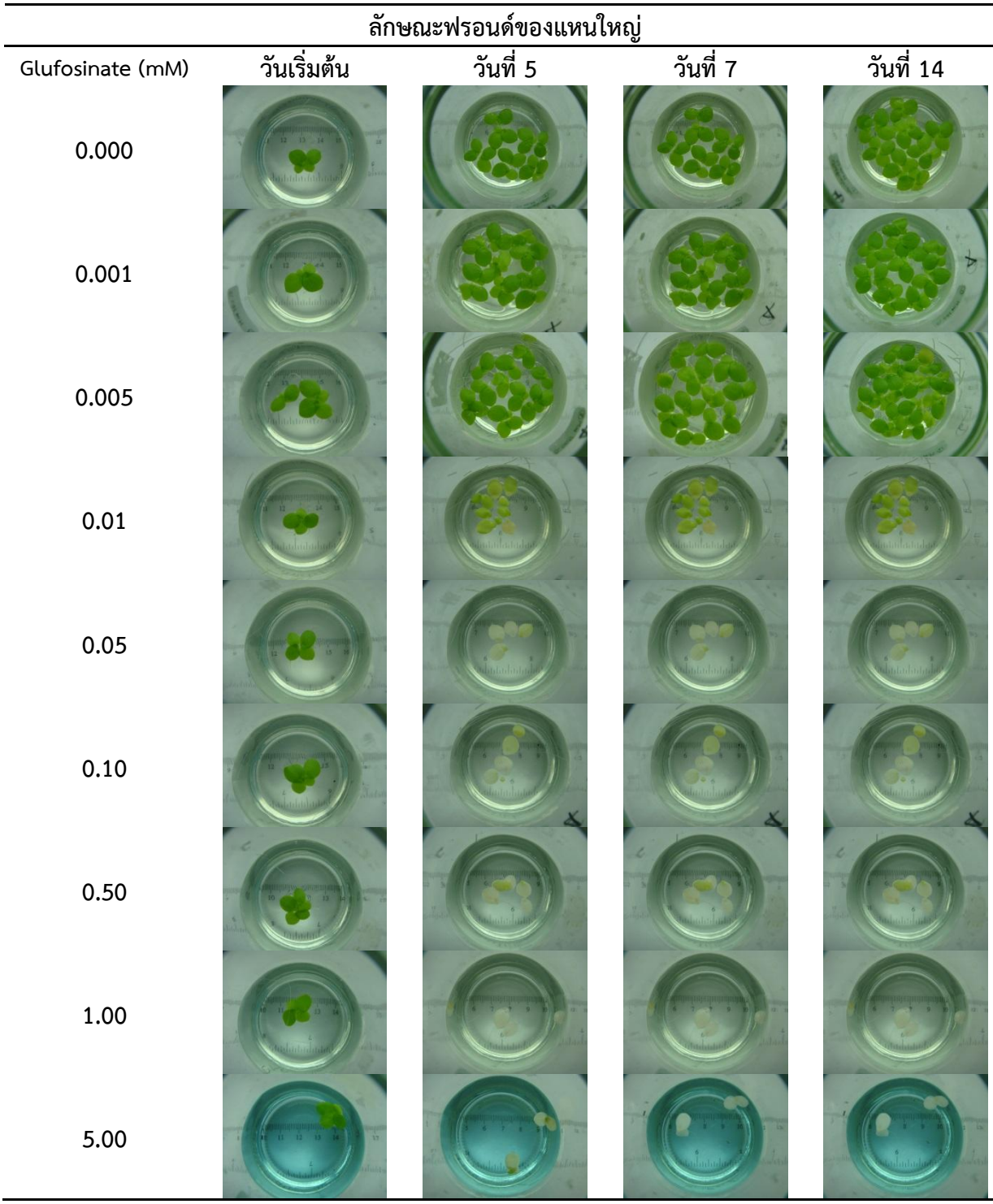
ภาพที่ 15 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนใหญ่โดยสารปราบวัชพืช glufosinate บนอาหารแข็ง MS ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน



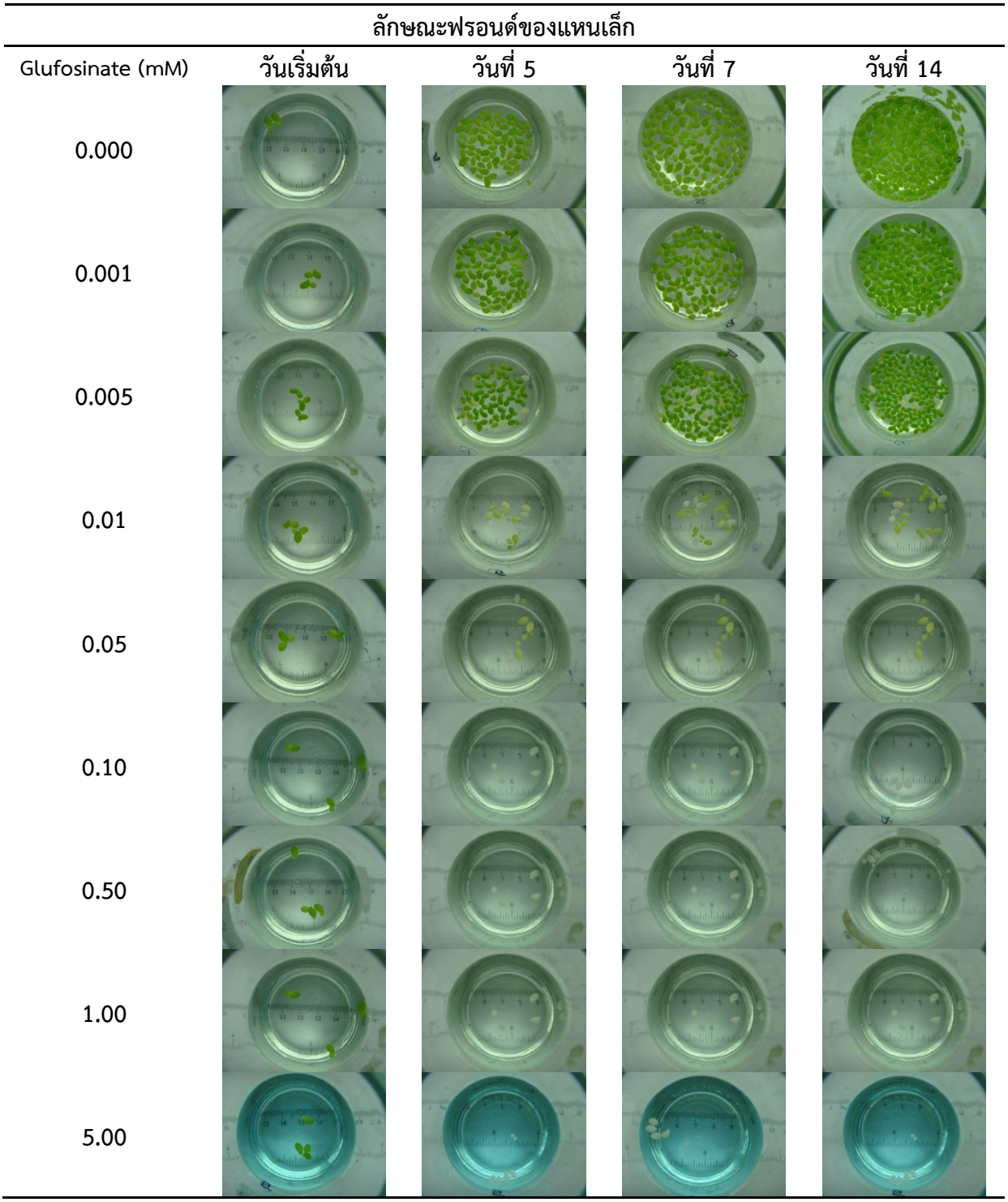
ภาพที่ 16 ผลของสารปราบวัชพืช glufosinate ต่ออัตราการเจริญเติบโตของแหนใหญ่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน



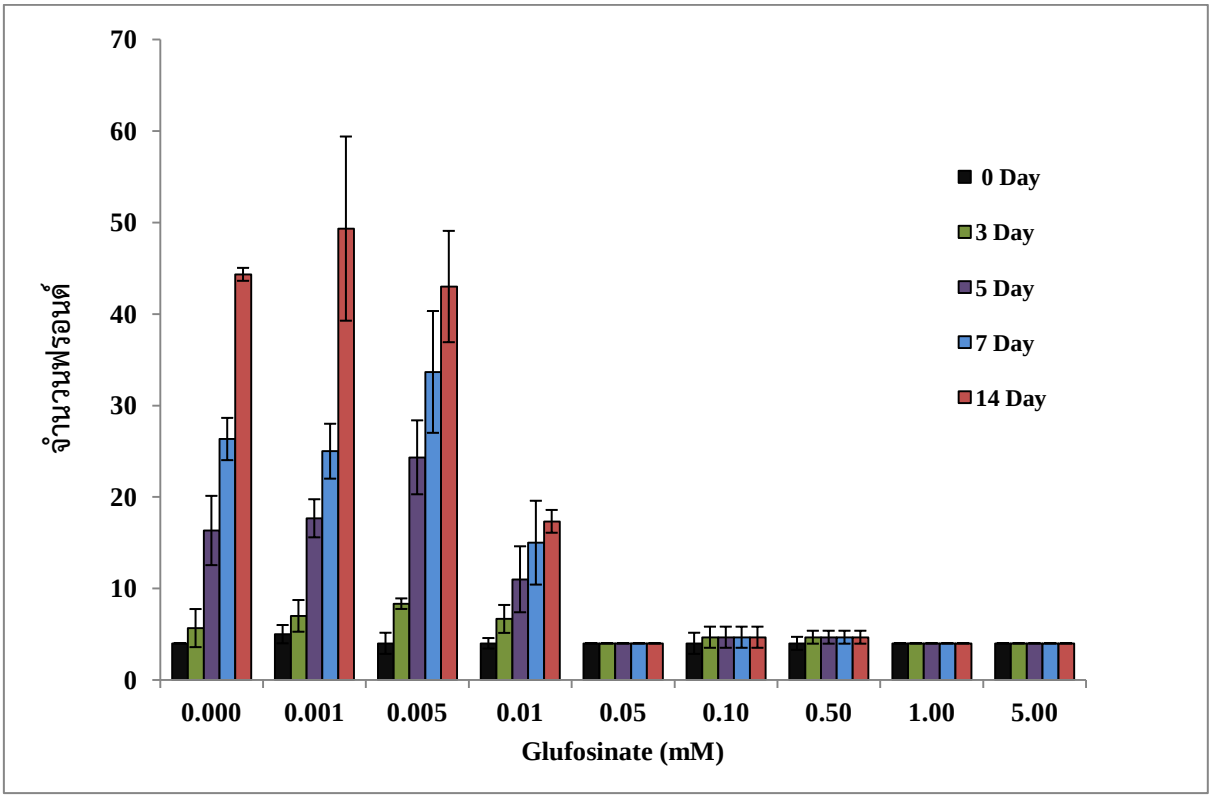
ภาพที่ 17 ผลของสารปราบวัชพืช glufosinate ต่ออัตราการเจริญเติบโตของแหนเล็ก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน

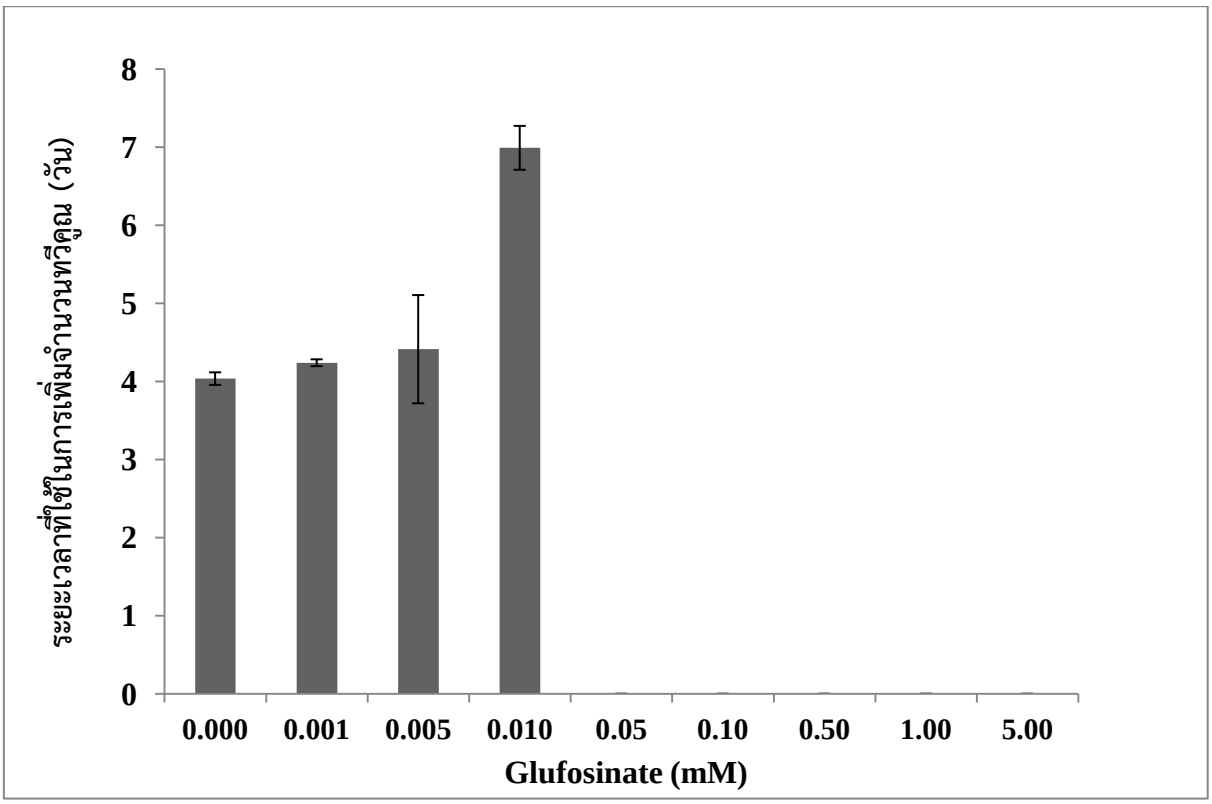


ภาพที่ 18 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนใหญ่โดยสารปราบวัชพืช glufosinate บนอาหาร Hoagland's E ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C ที่ความเข้มแสง 55 µ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน

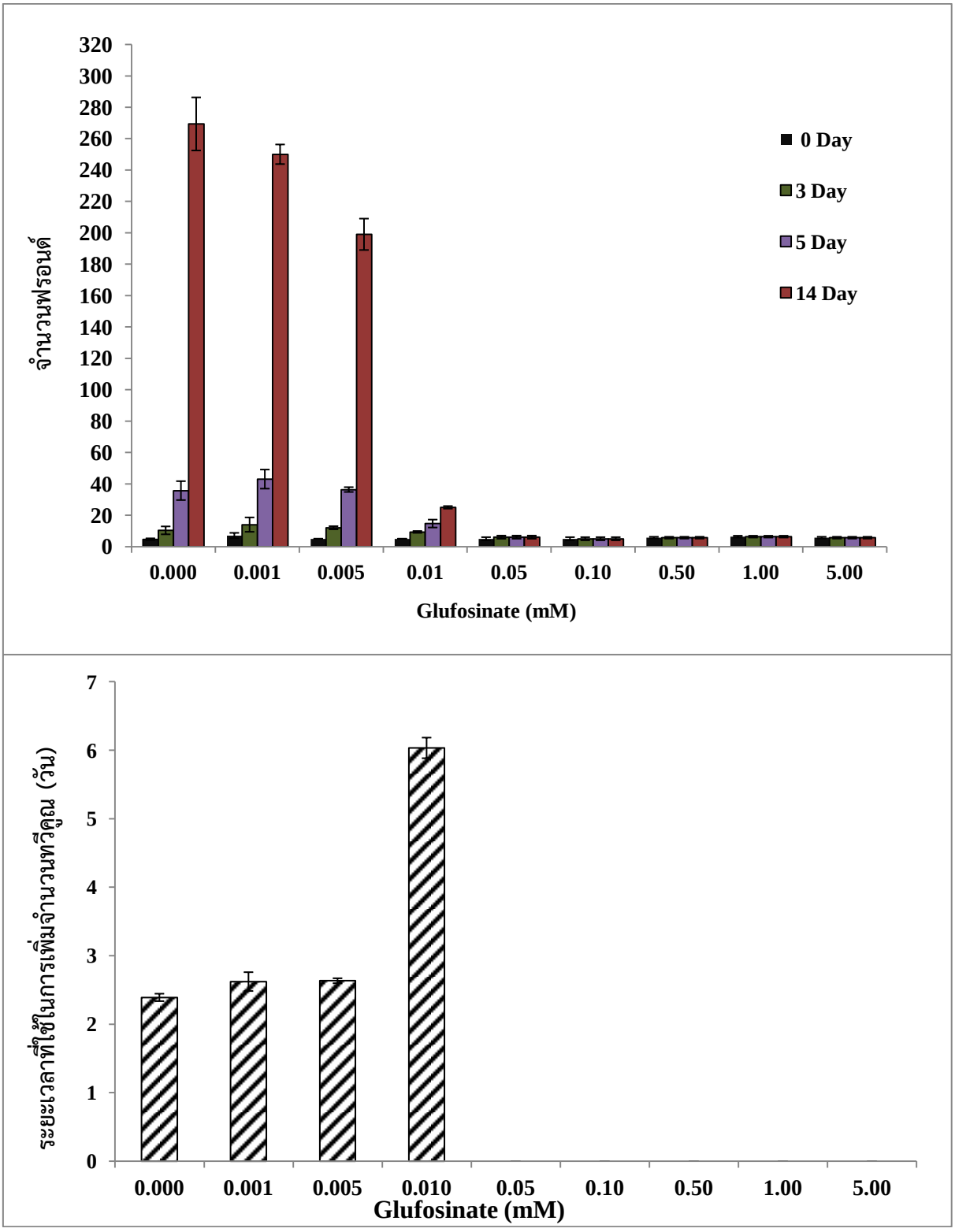


ภาพที่ 19 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนเล็กโดยสารปราบวัชพืช glufosinate บนอาหาร Hoagland's E ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน





ภาพที่ 20 ผลของสารปราบวัชพืช glufosinate ต่ออัตราการเจริญเติบโตของแหนใหญ่ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว Hoagland's E ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน



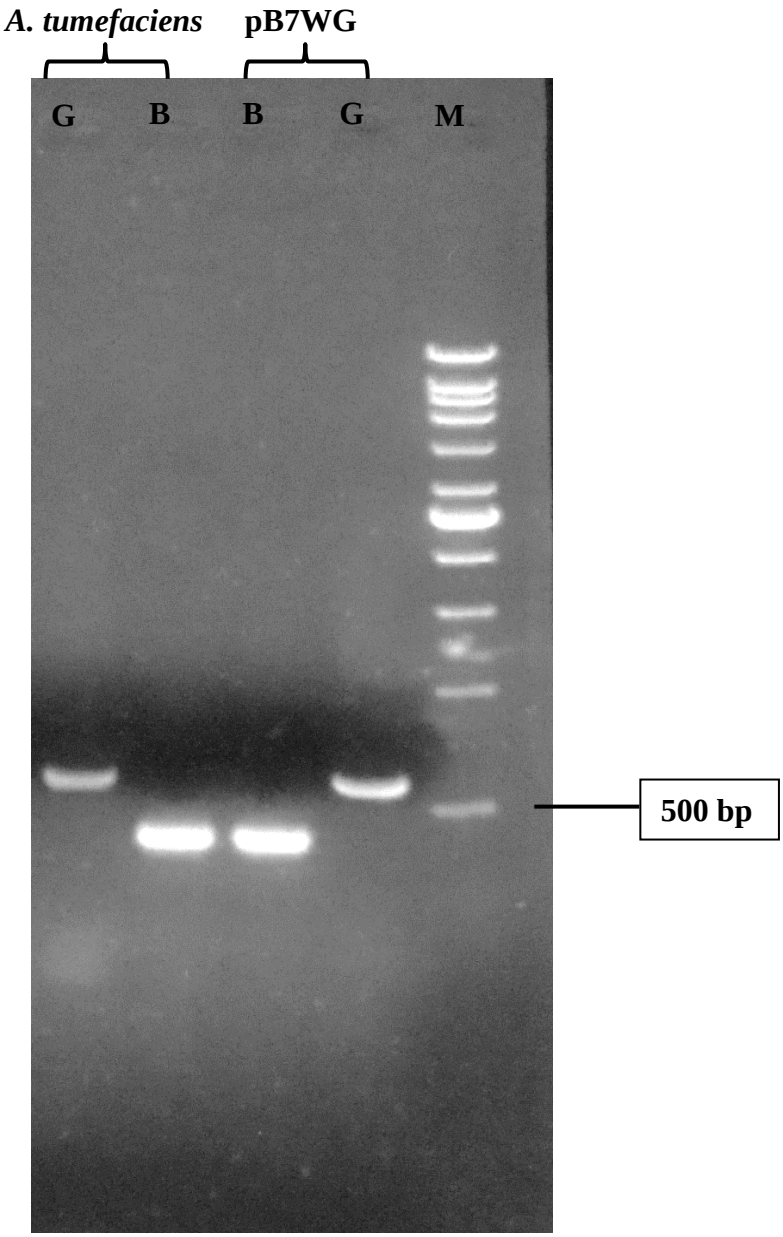
ภาพที่ 21 ผลของสารปราบวัชพืช glufosinate ต่ออัตราการเจริญเติบโตของแหนเล็ก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว Hoagland's E ในห้องควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C ที่ความเข้มแสง 55 μ.mol.m^{-2}.s^{-1} 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.7. การแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

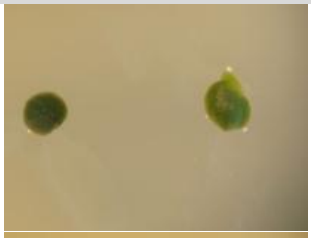
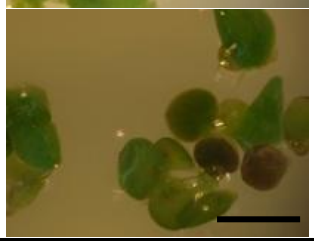
จากการทดลองวิธีต่างๆ ในการแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแคลลัส การจุ่มดอก หรือการเหนี่ยวนำให้เกิดบาดแผลบนฟรอนด์ แต่ทุกวิธีที่ดำเนินการไม่ประสบความสำเร็จและมีขั้นตอนยุ่งยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงลองเปลี่ยนมาใช้การแทรกซึมอะโกรแบคทีเรีย (agroinfiltration) เข้าสู่ทิวเรียนของแหนใหญ่ ซึ่งเปรียบเสมือนตาของพืชดอกอื่น โดยบ่มทิวเรียนร่วมกับอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pB7WG ที่ระยะเวลาการเอาอากาศออกแตกต่างกัน และตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pB7WG ในอะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการแปลงสภาพแหนโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (ภาพที่ 22) จากนั้นเลือกตัวอย่างแหนที่ผ่านการแปลงสภาพมาทดสอบการเข้าแทรกของยีน *Bar* และ *Egfp* โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เทียบกับยีนปกติที่พบในแหนได้แก่ *Actin* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ทิวเรียนโดยอาศัยอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ และการเอาอากาศออกเป็นเวลาเวลา 0, 5, 10 และ 20 นาที ได้ร้อยละของฟรอนด์ที่สามารถเจริญในอาหารที่เติมสารปราบวัชพืช glufosinate เท่ากับ 92.00%, 94.10%, 83.92%, และ 97.50% ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาทดสอบจีโนไทป์พบว่าการนำอากาศออกเป็นเวลา 5 นาทีพบการปรากฏอยู่ของยีน *Bar* และ *Egfp* สูงที่สุดที่ 80% (ตารางที่ 4) โดยแหนใหญ่ที่ได้รับการแปลงสภาพ หรือแหนดัดแปลงพันธุ (transgenic duckweeds) นั้นจะเจริญเติบโตช้ากว่าการเจริญบนอาหารปกติที่ไม่มีสารปราบวัชพืช glufosinate (ภาพที่ 23; MS3) และเมื่อนำมาตรวจจีโนไทป์โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์พบว่าแหนดัดแปลงพันธุ์มียีน *Bar* และ *Egfp* อยู่ในขณะที่แหนที่ไม่ได้รับการแปลงสภาพจะไม่พบยีนดังกล่าว (ภาพที่ 24)

ตารางที่ 4 จีโนไทป์ของแหนใหญ่ที่ผ่านกระบวนการแปลงสภาพด้วยเทคนิคการแทรกซึมผ่านของอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ทิวเรียน ที่ใช้ระยะเวลาในการนำอากาศออกแตกต่างกัน (ผลที่ได้คือค่าเฉลี่ยจาก 5 การทดลอง)

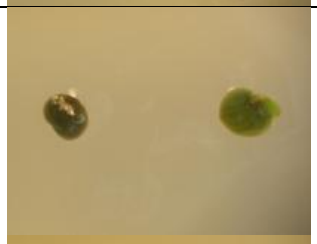
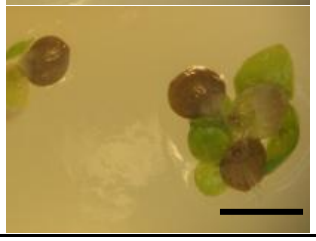
ระยะเวลาในการนำอากาศออก (นาที)	**ร้อยละของฟรอนด์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมสารปราบวัชพืช glufosinate**	**ร้อยละของจีโนไทป์ที่สอดคล้องกับความสามารถในการต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate และยีนชุดควบคุม *Actin***		
		Bar	***Egfp***	***Actin***
0	92.00±0.18	40.00±0.55	40.00±0.55	50.00±0.58
5	94.10±0.08	80.00±0.45	80.00±0.45	100.00±0.00
10	83.92±0.18	20.00±0.45	40.00±0.55	75.00±0.50
20	97.50±0.06	80.00±0.45	60.00±0.55	100.00±0.00
ชุดควบคุม	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00±0.00
pB7WG	-	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00



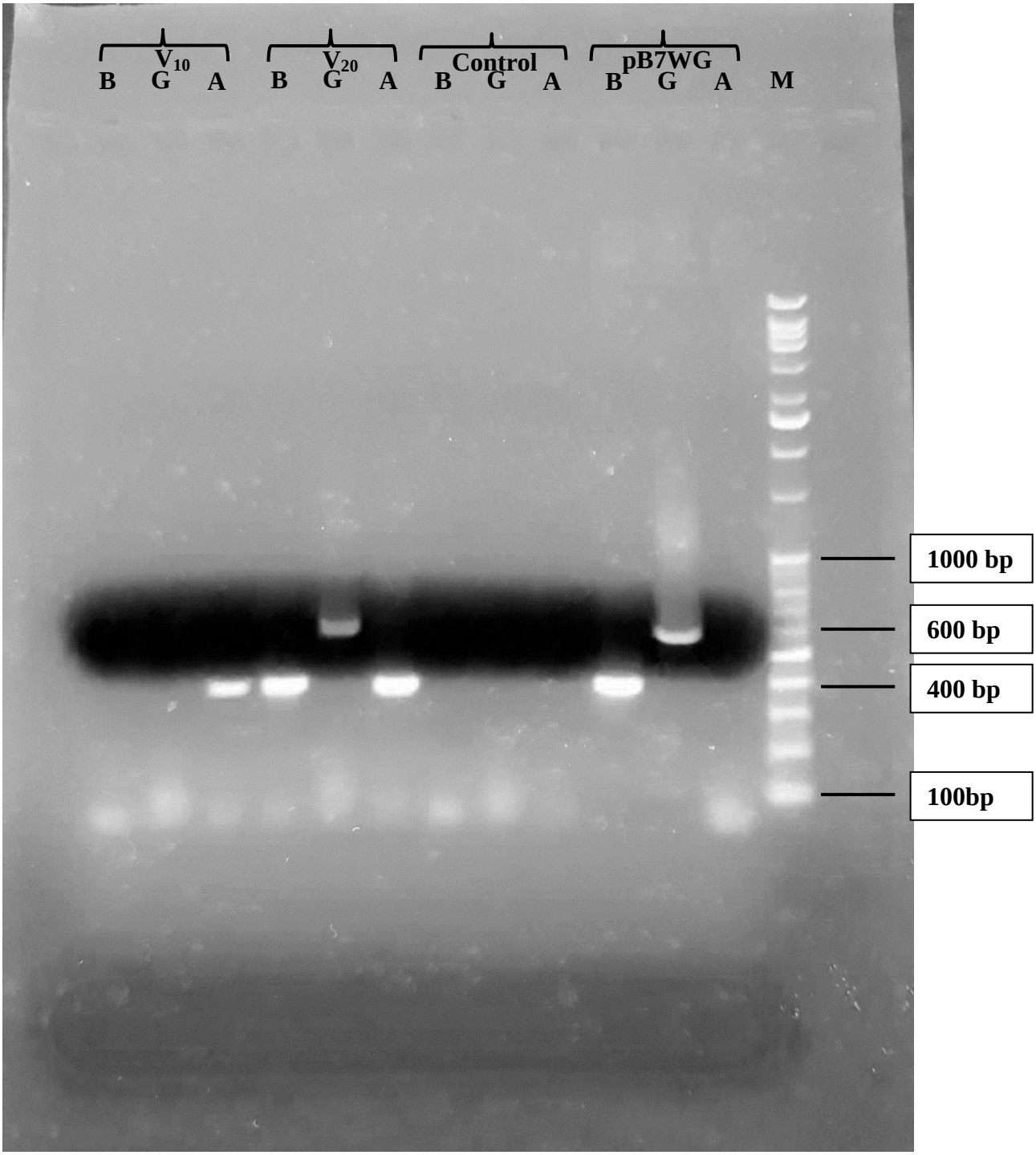
ภาพที่ 22 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อยีน *Egfp* และ *Bar* ใน *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิด pB7WG โดยเทียบกับการใช้ pB7WG เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ

ระยะเวลาที่ใช้ในการนำอากาศออก	อาหาร	ลักษณะฟรอนด์ของแหนใหญ่	
		วันเริ่มต้น	วันที่ 14
0 นาที	MS1		
	MS2		
	MS3		
5 นาที	MS1		
	MS2		
	MS3		

(ต่อ)

ระยะเวลาที่ใช้ในการนำอากาศออก	อาหาร	ลักษณะฟรอนด์ของแหนใหญ่	
		วันเริ่มต้น	วันที่ 14
10 นาที	MS1		
	MS2		
	MS3		
20 นาที	MS1		
	MS2		
	MS3		

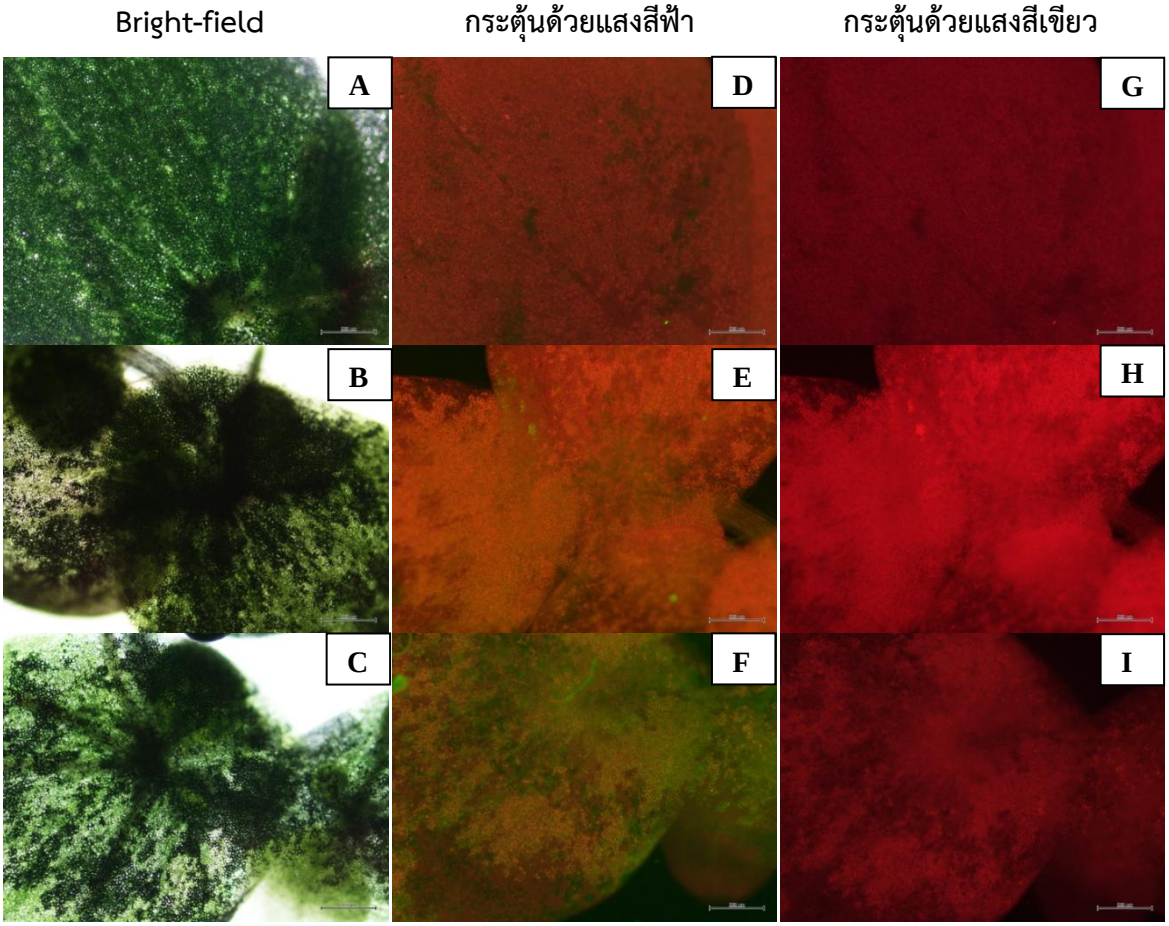
ภาพที่ 23 การเจริญเติบโตของทิวเรียนแหนใหญ่ที่ผ่านการแปลงสภาพโดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่ระยะเวลาการนำอากาศออกต่างกัน บนอาหาร MS (MS1: MS+ 1%sucrose, MS2: MS + 1%sucrose + 100 μM actosyringone + 250 mg/L ceftriaxone และ MS3: MS + 1%sucrose + 100μM acetosyringone + 250 mg/L ceftriaxone + 0.01 mM glufosinate) Scale bar = 1.0 cm



ภาพที่ 24 การตรวจสอบจีโนไทป์ของแหนใหญ่ที่ถูกแปลงสภาพ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะต่อยีน *Egfp*, *Bar* และ *Actin* ในแหนใหญ่ที่เจริญเติบโตบนอาหารที่มีสารปราบวัชพืช glufosinate โดย V10 และ V20 คือ แหนใหญ่ที่ผ่านการแปลงสภาพโดยนำเอาอากาศออก 10 และ 20 นาที ตามลำดับ; Control คือ แหนที่ไม่ได้ผ่านการแปลงสภาพ; pB7WG คือพลาสมิดที่ใช้ในการแปลงสภาพ; B, G และ A คือการตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Bar*, *Egfp* และ *Actin* ตามลำดับ

3.8. การติดตามการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงโดยการควบคุมของ *35S promoter*

เพื่อตรวจสอบว่าแหนดัดแปลงพันธุ์ที่ได้มีการแสดงออกของยีน *Egfp* หรือไม่ ผู้วิจัยจึงนำแหนดัดแปลงพันธุ์ไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อติดตามการผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein, GFP) โดยพบว่าแหนดัดแปลงพันธุมีการผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้า ซึ่งเมื่อรวมกับการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ซึ่งมีสีแดงจะเห็นการเรืองแสงเป็นเขียวส้ม (ภาพที่ 25E และ 25F) โดยไม่พบการเรืองแสงดังกล่าวในแหนที่ไม่ผ่านการแปลงสภาพ (ภาพที่ 25D) ทั้งนี้แหนดัดแปลงพันธุ์มีการเจริญเติบโตที่ช้าและมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้อาหารที่มีสารปราบวัชพืช glufosinate (ภาพที่ 25B และ 25C)



ภาพที่ 25 แหนดัดแปลงพันธุสามารถผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) โดยสามารถสังเกตเห็นการเรืองแสงสีเขียวส้มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จากแหนดัดแปลงพันธุ์ (E,F) เมื่อกระตุ้นด้วยสีฟ้า แต่เห็นเป็นสีแดงสีเดียวจากการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ในแหนที่ไม่ผ่านการแปลงสภาพ (D) โดย A,D,G คือแหนใหญ่ที่ไม่ผ่านการแปลงสภาพ B,E,H คือตัวแทนแหนใหญ่ที่ผ่านการแปลงสภาพโดยนำเอาอากาศออก 10 นาที และ C,F,I คือตัวแทนแหนใหญ่ที่ผ่านการแปลงสภาพโดยนำเอาอากาศออก 20 นาที

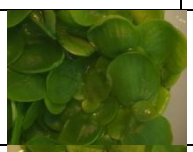
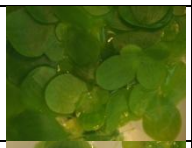
3.9. การทดสอบแหนที่ผ่านการแปลงสภาพในห้องทดลอง

เพื่อตรวจสอบว่าแหนใหญ่ดัดแปลงพันธุ์ที่ได้มีความเสถียรทางพันธุกรรมหรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้นำแหนใหญ่ที่ถูกแปลงสภาพและตรวจสอบแล้วว่ามียีน *Egfp* และ *Bar* มาเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 20 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์จีโนไทป์โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแหนใหญ่ดัดแปลงพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร MS ที่เติมสารปราบวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้น 0.005 mM และโตได้ดีในอาหาร MS ปกติที่ไม่ได้เติมสารปราบวัชพืช glufosinate แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารปราบวัชพืช glufosinate ความเข้มข้น 0.01 mM ซึ่งไม่ต่างจากแหนชุดควบคุมที่ไม่ได้ถูกแปลงสภาพ (ตารางที่ 5 และ 6) และเมื่อนำมาวิเคราะห์จีโนไทป์หรือการคงอยู่ของยีน *Egfp* และ *Bar* แล้ว พบว่ายีน *Egfp* ได้หายไปจากแหนดัดแปลงพันธุ์ แต่พบยีน *Bar* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะการต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate หลงเหลืออยู่ในบางฟรอนด์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ร้อยละการรอดชีวิตและจีโนไทป์ของแหนใหญ่ดัดแปลงพันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 20 วันในอาหาร MS (ผลที่ได้คือค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)

ระยะเวลาในการนำอากาศออก (นาที)	**ร้อยละของฟรอนด์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมสารปราบวัชพืช glufosinate**			**ร้อยละของจีโนไทป์ที่สอดคล้องกับความสามารถในการต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate และยีนชุดควบคุม Actin**		
	0mM Glufosinate	0.005mM Glufosinate	0.01mM Glufosinate	*Bar*	*Gfp*	*Actin*
0	95.00±7.07	85.00±7.07	0.00±0.00	50.00±0.71	0.00±0.00	50.00±0.71
5	100.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00±0.00
10	90.00±0.00	85.00±7.07	0.00±0.00	50.00±0.71	0.00±0.00	50.00±0.71
20	100.00±0.00	90.00±14.14	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ชุดควบคุม	95.00±7.07	80.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00±0.00
pB7WG	-	-	-	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

ตารางที่ 6 การเจริญเติบโตของแหนใหญ่แปลงพันธุ์เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมและไม่เติม glufosinate เป็นระยะเวลา 20 วัน (scale bar = 0.5 cm)

ระยะเวลาในการนำอากาศออก (นาที)	MS+1%sucrose		MS+1%sucrose+ 0.005 mM glufosinate		MS+1%sucrose+ 0.01 mM glufosinate	
	วันเริ่มต้น	วันที่ 20	วันเริ่มต้น	วันที่ 20	วันเริ่มต้น	วันที่ 20
0						
5						
10						
20						

4. อภิปรายผลการวิจัย

4.1. การจำแนกสายพันธุ์แหน

เนื่องจากแหนเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดในโลกแต่เจริญเติบโตได้เร็ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาชีววิทยาของแหน เพื่อใช้แหนเป็นพืชต้นแบบและใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป โดยในขั้นแรกได้ทำการจำแนกชนิดของแหนที่พบบริเวณแหล่งน้ำภายในโรงเรียนสาธิตพิบูลบำเพ็ญ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยได้ทำการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนและนำมาศึกษาการเจริญเติบโตภายในห้องปฏิบัติการ (รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 ของโครงการ) และนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และศึกษาปัจจัยในการส่งผลให้แหนออกดอก (รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2 ของโครงการ) เมื่อได้ข้อมูลดังกล่าวแล้วขั้นต่อไปคือการจำแนกชนิดของแหนด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา จากผลการศึกษาทางอณูชีววิทยาบ่งชี้ว่าแหน 2 ชนิดใน 3 ชนิด ที่นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้น เป็นแหนใหญ่ *Spirodela polyrhiza* และไข่น้ำ *Wolffia globosa* ดังที่เคยรายงานไว้ (รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 ของโครงการ) แต่แหนเล็กที่ได้กลับได้ต่างสายพันธุ์ จากที่เคยระบุว่าเป็น *Lemna minor* แต่ข้อมูลทางพันธุกรรมระบุชัดว่าแหนเล็กที่นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการคือ แหนเล็กสายพันธุ์ *Lemna aequinoctialis* ซึ่งเคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายที่พบในแหนชนิดนี้ตามธรรมชาติใน

ประเทศไทย (Kittiwongwattana and Thawai, 2015) และลักษณะที่แตกต่างจากแหนเล็ก *L. minor* คือ ปลายฟรอนด์ด้านโคนของ *L. aequinoctialis* จะมีลักษณะค่อนข้างแหลมกว่าและมีที่ห่อหุ้มบริเวณโคนรากซึ่งมีลักษณะคล้ายปีกยื่นออกมา (Azer, 2013) อย่างไรก็ตามแหนเล็กสายพันธุ์นี้ยังมีความแตกต่างจากแหนเล็กสายพันธุ์เดียวกันที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล ได้แก่ *L. aequinoctialis* DW2601-1 ซึ่งพบในประเทศจีน (Xu et al, 2015) แสดงให้เห็นว่าแหนเล็กที่พบบริเวณมหาวิทยาลัยบูรพาเป็นแหนเล็กสายพันธุ์ *L. aequinoctialis* ที่มีการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมส่งผลให้มีอีโคไทป์ (ecotype) ที่แตกต่างไปจากแหนเล็กชนิดดังกล่าวที่พบบริเวณอื่น

4.2. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอก

ถึงแม้ว่าแหนจะเป็นพืชดอก แต่ในธรรมชาตินั้นพบการออกดอกของแหนน้อยมาก เนื่องจากแหนมีการควบคุมไม่ให้เข้าสู่ระยะโตเต็มไวที่พร้อมจะออกดอก ดังนั้นจึงพบการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศเป็นส่วนใหญ่ในธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์แหนในอนาคตผู้วิจัยจึงศึกษาการออกดอกของแหนโดยใช้สารเคมีและแสงชนิดต่างๆ แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการเหนี่ยวนำให้แหนออกดอก (รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 2 ของโครงการ) ผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนเป็นการให้สารที่เหนี่ยวนำให้พืชออกดอก ได้แก่ กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และเพิ่มความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแหน โดยผู้วิจัยพบว่าการให้แสงขาวที่เข้มมากพอ (100 $\mu.mol.m^{-2}.s^{-1}$) เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 24 ชั่วโมงต่อวัน ร่วมกับการใก้กรดซาลิไซลิกสามารถเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอกได้ แต่ไม่ส่งผลต่อการออกดอกของแหนเล็ก โดยลักษณะฟรอนด์ของแหนใหญ่ที่ออกดอกนั้นจะมีขนาดเล็กและหนากว่าปกติซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นของกรดซาลิไซลิก แสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้แหนใหญ่ออกดอกคือความพร้อมของฟรอนด์หรือปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สะสมซึ่งขึ้นอยู่กบการสังเคราะห์ด้วยแสงและการเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมนพืช เช่น กรดซาลิไซลิก โดยลักษณะดอกของแหนใหญ่นั้นจะมีเกสรตัวผู้เป็นคู่และมีเกสรตัวเมียอยู่ตรงกลาง ซึ่งพบเห็นได้น้อยมากในธรรมชาติ ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอกได้ภายในระยะเวลา 14 วัน (ภาพที่ 4) และพัฒนาเป็นเมล็ดภายในระยะเวลา 14 วัน สามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการสอนกระบวนการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศในพืชดอกได้ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตั้งแต่กระบวนการสร้างดอก การปฏิสนธิ และการสร้างเมล็ด และสามารถใช้พัฒนาแหนดัดแปลงพันธุ์ให้ได้คุณลักษณะที่ต้องการมากกว่าลักษณะเดียวโดยการผสมระหว่างแหนดัดแปลงพันธุ์ 2 สายพันธุ์ เป็นต้น

4.3. การชักนำให้เกิดแคลลัสในแหนเล็ก

วิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการแปลงสภาพแหนคือการถ่ายยีนเข้าแคลลัส (callus) หรือเนื้อเยื่อที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ โดยการชักนำให้ส่วนต่างๆ ของแหนพัฒนาเป็นก้อนแคลลัสโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่แหนผ่านอะโกรแบคทีเรีย จากการศึกษาผู้วิจัยพบว่าแหนเล็กสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ง่ายโดยใช้ฮอร์โมนออกซินสังเคราะห์ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ภายในระยะเวลา 14 วัน และก้อนแคลลัสจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงวันที่ 28 จึงจะเริ่มมีสีเหลือง ซึ่งแสดงถึงการขาดอาหาร โดยแคลลัสที่ได้นี้สามารถนำไปชักนำต่อให้เกิดฟรอนด์ใหม่ภายในระยะเวลา 14 วัน โดยเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลและฮฮร์โมน 2,4-D หรือนำไปแปลงสภาพโดยเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียได้ แต่ปัญหาที่พบส่วนใหญ่คือแคลลัสมีความบอบบางและง่ายต่อการปนเปื้อนจึงส่งผลให้การดูแลรักษาแคลลัสเป็นไปด้วยความยากลำบาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจแนวทางอื่นในการแปลงสภาพแหน

4.4. การเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียน

การสร้างทิวเรียน (turion) ในแหนเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้แหนสามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสม คล้ายกับการจำศีลของสัตว์ โดยโครงสร้างดังกล่าวจะมีลักษณะเล็กกว่าฟรอนด์ และมีองค์ประกอบของแป้งอยู่มากเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเมื่อผ่านช่วงที่ไม่เหมาะสมไปแล้ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำทิวเรียนมาใช้เป็นเนื้อเยื่อที่ใช้รับการส่งถ่ายยีนเพื่อใช้ในการแปลงสภาพแหน โดยศึกษาการเหนี่ยวนำให้แหนสร้างทิวเรียน โดยทั่วไปแหนจะตอบสนองต่อฮอร์โมนกรดแอบไซซิกส่งผลให้เข้าสู่ระยะพักตัว แต่การให้กรดแอบไซซิกอาจส่งผลต่อการถ่ายฝากยีนโดยอาศัยอะโกรแบคทีเรียต่อไปเพราะการใช้กรดแอบไซซิกส่งผลต่อการกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองของพืชในสภาวะไม่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้น้ำกรองที่ผ่านกระบวนการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนในการเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียนอันเนื่องมาจากการขาดสารอาหาร ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียนได้ภายในระยะเวลา 14 วัน โดยทิวเรียนที่ได้จะจมลงในน้ำ และสามารถนำมากระตุ้นให้เจริญต่อไปเป็นฟรอนด์ใหม่เมื่อเจอสภาวะที่อาหารเพียงพอต่อไป ซึ่งกระบวนการเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียนโดยใช้นำเป็นกระบวนการที่สะดวก ประหยัดและได้ผลที่แน่นอน ส่งผลให้ผู้วิจัยทำการศึกษาการแปลงสภาพแหนโดยใช้ทิวเรียนต่อไป

4.5. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปราบวัชพืช glufosinate ในการคัดเลือกแหนที่ถูกแปลงสภาพ

ในการแปลงสภาพแหนผู้วิจัยใช้กระบวนการคัดเลือกแหนที่ได้รับยีนต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate ดังนั้นเพื่อให้กระบวนการคัดเลือกมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยจึงศึกษาหาความเข้มข้นของสารปราบวัชพืชที่เหมาะสมในการใช้สำหรับคัดเลือกแหนที่ถูกแปลงสภาพ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 mM เป็นความ

เข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนเล็กและแหนใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยแหนใหญ่จะต้านทานสารปราบวัชพืชได้น้อยกว่าแหนเล็กเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ดังนั้นในการคัดเลือกแหนใหญ่ที่ถูกแปลงสภาพผู้วิจัยจึงใช้ความเข้มข้นของสารปราบวัชพืช glufosinate ที่ 0.01 mM นอกจากนี้ในการทดสอบผลของยาปฏิชีวนะ ceftriaxone ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของอะโกรแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของแหนใหญ่พบว่าความเข้มข้นของ ceftriaxone ที่ความเข้มข้น 250 ug/ml ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแหนใหญ่แต่ที่ความเข้มข้น 100 ug/ml ส่งผลให้อะโกรแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารปาบวัชพืช glufosinate ที่ 0.01 mM และยาปฏิชีวนะ ceftriaxone ที่ความเข้มข้น 250 ug/ml ในกระบวนการแปลงสภาพแหนใหญ่ต่อไป

4.6. การแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการแปลงสภาพแหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในดอกและแคลลัสแต่ประสบปัญหาคือการเหนี่ยวนำให้แหนออกดอกนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการซึ่งส่งผลให้ในบางครั้งแหนไม่ออกดอกตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ และแหนจะออกดอกแค่ฟรอนด์ละดอกโดยแต่ละดอกจะมีขนาดเล็กมากและพัฒนาไปเป็นผลซึ่งมีเพียง 2-3 เมล็ดในแต่ละผลทำให้ประสิทธิภาพในการแปลงสภาพต่ำและทำได้ยากในทางปฏิบัติ ในขณะที่กระบวนการชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่แหน แต่ต้องอาศัยอุปกรณ์ช่วยและทำภายใต้สภาวะที่ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนเท่านั้นทำให้การดูแลเป็นไปได้ด้วยความยากลำบาก ซึ่งผู้วิจัยได้ใช้เวลาในการพัฒนาทั้งสองวิธีดังกล่าวมาเป็นระยะเวลานานแต่ไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการถ่ายยีนเข้าสู่แหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะผ่านทางทิวเรียนและการนำอากาศออกเพื่อให้อะโกรแบคทีเรียเข้าถึงเนื้อเยื่อเจริญของแหนภายในทิวเรียนได้ดีขึ้น โดยเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับทิวเรียและสารเหนี่ยวนำให้เกิดการเข้าหาของอะโกรแบคทีเรีย acetosyringone แล้วมาคัดเลือกบนอาหารที่มีสารปราบวัชพืช glufosinate ยาปฏิชีวนะ ceftriaxone ในภายหลัง ผู้วิจัยพบว่ากระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่ง่าย ทำซ้ำได้ และให้ผลในการแปลงสภาพแหนได้ดี โดยสังเกตได้จากร้อยละของจำนวนฟรอนด์ที่พัฒนามาจากทิวเรียนและสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารปราบวัชพืช glufosinate มากกว่าร้อยละ 80 และเมื่อนำมาตรวจสอบจีโนไทป์โดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือเทคนิคพีซีอาร์พบว่าแหนที่ถูกแปลงสภาพดังกล่าวเป็นแหนดัดแปลงพันธุ์ในช่วงร้อยละ 20 – 80 ซึ่งกระบวนการการนำอากาศออกมีแนวโน้มในการเพิ่มประสิทธิภาพของการแปลงสภาพเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าการนำอากาศออกไม่จำเป็นสำหรับกระบวนการแปลงสภาพแหนใหญ่โดยใช้อะโกรแบคทีเรียผ่านทางทิวเรียน

4.7. การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงในแหนใหญ่แปลงพันธุ์

เมื่อผู้วิจัยคัดเลือกแหนที่ถูกแปลงสภาพโดยใช้ยาปราบวัชพืช glufosinate แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) โดยนำแหนใหญ่ที่ถูกแปลงสภาพไปตรวจสอบการเรืองแสงสีเขียวภายใต้การให้แสงสีฟ้า เนื่องจากกระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่แหนใหญ่โดยอะโกรแบคทีเรียนั้นจะเป็นการแทรกยีนแบบสุ่มส่งผลให้ตำแหน่งและจำนวนที่ยีนเข้าไปแทรกในแต่ละฟรอนด์หรือแต่ละเซลล์ตั้งต้นไม่เหมือนกันทำให้การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงแตกต่างกัน เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ไม่มีตัวแยกแสงในแต่ละช่วงแสงส่งผลให้การเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวถูกรบกวนด้วยการเรืองแสงสีแดงของคลอโรฟิลล์ส่งผลให้เห็นเป็นสีส้มหรือสีเหลืองในกรณีที่การเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวมีมาก เพื่อแสดงให้เห็นว่าการเรืองแสงสีเขียวนั้นมาจากยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่ใส่เข้าไปไม่ได้มีอยู่แล้วในแหน ผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบให้เห็นถึงการเรืองแสงสีแดงเมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีเขียว และการเรืองแสงของแหนที่ไม่ได้ถูกแปลงสภาพว่ามีความแตกต่างจากแหนดัดแปลงพันธุ์ โดยจะสังเกตได้ว่าเมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้าแหนที่ไม่ได้ถูกแปลงสภาพจะเรืองแสงสีแดงเทียบกับสีส้มในแหนดัดแปลงพันธุ์ และเมื่อกระตุ้นด้วยแสงสีเขียวทั้งแหนที่ไม่ถูกแปลงสภาพและแหนดัดแปลงพันธุ์เรืองแสงสีแดงไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการเรืองแสงสีเขียวนั้นพบเฉพาะในแหนดัดแปลงพันธุ์เท่านั้น และการเรืองแสงดังกล่าวไม่ได้เกิดจากสารที่เรืองแสงตามธรรมชาติ (autofluorescence) ที่มักพบการเรืองแสงเมื่อกระตุ้นด้วยแสงทุกสี เนื่องจากไม่พบการเรืองแสงที่แตกต่างกันเมื่อได้รับการกระตุ้นจากแสงสีเขียวแต่แตกต่างกันเมื่อได้รับการกระตุ้นจากแสงสีฟ้า ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบยีน *Egfp* ซึ่งแสดงออกได้เป็นโปรตีนเรืองแสงสีเขียวในแหนใหญ่แปลงพันธุ์เท่านั้น อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสามารถทำให้ชัดเจนเพิ่มขึ้นได้โดยการทำ western blot ซึ่งจะยืนยันได้แน่นอนว่ามีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวจริงควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ แต่ต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเรืองแสงในการตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าว

4.8. การทดสอบแหนที่ผ่านการแปลงสภาพในห้องทดลอง

ปัญหาหลักของการพัฒนาพืชแปลงพันธุคือความเสถียรของยีนที่ใส่เข้าไปในพืช ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบความเสถียรของยีนที่ใส่เข้าไปในแหนใหญ่โดยนำแหนใหญ่แปลงพันธุ์มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารคัดเลือกที่มีสารปราบวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้น 0.01 mM และพบว่าแหนใหญ่แปลงพันธุ์สูญเสียความสามารถในการต้านทานสารปราบวัชพืชที่ความเข้มข้นดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงลดความเข้มข้นของสารปราบวัชพืช glufosinate ลงเหลือ 0.005 mM ซึ่งส่งผลให้แหนแปลงพันธุ์และแหนที่ไม่ถูกแปลงสภาพ

เจริญเติบโตได้จากนั้นจึงนำมาทดสอบจีโนไทป์ โดยพบว่าแหนบางส่วนสูญเสียยีนต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate (*Bar*) ในขณะที่แหนใหญ่ทั้งหมดสูญเสียยีนโปรตีนเรืองแสง (*Egfp*) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่แหนใหญ่ที่พัฒนานั้นสามารถถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่แหนใหญ่ได้ แต่เมื่อแหนใหญ่ได้รับยีนดังกล่าวไปแล้วแหนใหญ่ไม่สามารถรักษายีนนั้นให้คงอยู่ในจีโนมได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะการแทรกยีนเข้าไปไหนแหนใหญ่โดยใช้ T-DNA ผ่านอะโกรแบคทีเรียนั้นอาจไม่เหมาะสมกับจีโนมของแหนใหญ่ เนื่องจากตามธรรมชาติอะโกรแบคทีเรียไม่เข้าไปติดต่อแหนใหญ่ กอปรกับแหนใหญ่มีการแปรผันของดีเอ็นเอในจีโนมน้อยเมื่อเทียบกับแหนชนิดอื่น ดังนั้นเมื่อมียีนแปลกปลอมเข้าไปแทรกในจีโนมแหนใหญ่อาจส่งผลให้แหนใหญ่ขับยีนดังกล่าวออกโดยใช้กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าการพัฒนาแหนใหญ่แปลงพันธุ์เพื่อใช้ในเทคโลยีชีวภาพในปัจจุบันสามารถทำได้โดยการเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่แสดงออกยีนที่ต้องการชั่วคราวเท่านั้น โดยอาจมีการปรับปรุงไบนารีเวคเตอร์ที่ใช้ให้เหมาะสมกับการแทรกของยีนที่ต้องการในอนาคตเพื่อให้ได้แหนแปลงพันธุ์ที่มีความเสถียรและสามารถถ่ายทอดยีนที่ต้องการไปสู่รุ่นลูกหลานได้ โดยกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

5. สรุปผลการวิจัย

การวิจัยชิ้นนี้จัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาแหนซึ่งเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดและไม่ออกดอกในสภาวะปกติให้เป็นพืชน้ำต้นแบบในการศึกษาทางชีววิทยาและการนำไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยผู้วิจัยได้จำแนกชนิดแหนที่พบในแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยบูรพาได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แหนใหญ่ (*Spirodela polyrhiza*) แหนเล็ก (*Lemna aequinoctialis*) และไข่น้ำ (*Wolffia globosa*) โดยนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและเหนี่ยวนำให้แหนใหญ่ออกดอกโดยควบคุมความเข้มแสงและความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิก รวมถึงการชักนำให้แหนเล็กพัฒนาเป็นแคลลัสโดยใช้สาร 2,4-D และการชักนำให้แหนใหญ่สร้างทิวเรียนซึ่งเป็นฟรอนด์ที่ใช้สะสมอาหารสำหรับการพักตัวโดยใช้สภาวะขาดแคลนอาหาร นอกจากนี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนต้านทานสารปราบวัชพืช glufosinate (*Bar*) และยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (*Egfp*) เข้าสู่แหนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผ่านทางทิวเรียน แต่การแทรกตัวของยีนดังกล่าวยังไม่เสถียรส่งผลให้ไม่สามารถถ่ายทอดยีนดังกล่าวไปสู่แหนรุ่นต่อไปได้ อย่างไรก็ตามผลการวิจัยดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนชีววิทยาของแหน และใช้เป็นแนวทางในการสร้างแหนดัดแปลงพันธุ์ได้ต่อไปในอนาคต

6. ผลผลิต

6.1. ผลงานตีพิมพ์

6.1.1. อรไพลิน ใจประเสริฐ ฉัตรมณี ศรสังข์ทอง ณัฐพร แสงอรุณ และสลิล ชั้นโรจน์. (2559) อิทธิพลของคุณภาพแสง กรดซาลิไซลิก และกรดจิบเบอเรลลิก ต่อการเจริญเติบโตของแหนเล็ก และแหนใหญ่. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้ง ที่ 8 วันที่ 30-31 พฤษภาคม พ.ศ.2559 มหาวิทยาลัยพะเยา. หน้า 324-329.

6.1.2. อรไพลิน ใจประเสริฐ และสลิล ชั้นโรจน์. (2560) Identification and Cultivation of Duckweeds Collected from Burapha University, Chonburi Province, Thailand. การนำเสนอแบบโปสเตอร์ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 20 วันที่ 15-17 มิถุนายน พ.ศ.2560 โรงแรมโนโวเทล กรุงเทพฯ สุขุมวิท 20.

6.1.3. Aornpilin Jaiprasert and Salil Chanroj. (2017) Identification and cultivation of duckweeds collected from Burapha university, Chonburi province, Thailand. Manuscript in preparation.

6.1.4. Aornpilin Jaiprasert and Salil Chanroj. (2017) Protein, carbohydrate and oxalate contents of *Spirodela polyrhiza*, *Lemna aequinoctialis* and *Wolffia globosa* cultured in the laboratory. Manuscript in preparation.

6.1.5. Aornpilin Jaiprasert and Salil Chanroj. (2018) A simple agrobacterium-mediated transformation method for generation of transgenic giant duckweeds via turions. Manuscript in preparation.

6.2. การจดสิทธิบัตร

วิธีการแปลงสภาพแหนใหญ่โดยใช้อะโกรแบคทีเรียผ่านทางทิวเรียน คาดว่าจะยื่นขอในปี พ.ศ.2561

6.3. ผลงานเชิงสาธารณะ

6.3.1. นำไปใช้บูรณาการกับการเรียนการสอนรายวิชา 307331 เทคโนโลยีชีวภาพทางพืช 307334 ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ และ 30665059 เทคโนโลยีชีวภาพของพืชขั้นสูง

6.3.2. นำไปบูรณาการกับการบริการวิชาการในการจัดงานสัปดาห์วันวิทยาศาสตร์แห่งชาติภาคตะวันออก ครั้งที่ 33 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802410 **สัญญาเลขที่** 30/2558

โครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาแหนเพื่อเป็นพืชน้ำต้นแบบในการวิจัยพื้นฐานและการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร.สลิล ชั้นโรจน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2557 **ถึงวันที่** 1 สิงหาคม พ.ศ.2560

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 234,000 **บาท** **เมื่อ** 31 ตุลาคม พ.ศ.2557

งวดที่ 2 (40%) 187,200 **บาท** **เมื่อ** 19 พฤษภาคม พ.ศ.2558

งวดที่ 3 (10%) 46,800 **บาท** **เมื่อ** ยังไม่ได้รับ

รวม 468,000 **บาท**

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	24,000	24,000	0
2. ค่าจ้าง	178,000	178,000	0
3. ค่าวัสดุ	176,000	200,880	-24,880
4. ค่าใช้สอย	90,000	65,120	24,880
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	-	-	-
รวม	468,000	468,000	0

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

Azer, S. A. (2013). Taxonomic revision of genus *Lemna* L.(lemnaceae gray) in Egypt. Annals of Agricultural Sciences, 58(2), 257-263.

Hillman, W. S. (1976). Calibrating duckweeds: light, clocks, metabolism, flowering. Science, 193(4252), 453-458.

Kittiwongwattana, C., & Thawai, C. (2015). *Paenibacillus lemnae* sp. nov., an endophytic bacterium of duckweed (*Lemna aequinoctialis*). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65(1), 107-112.

Xu, Y., Ma, S., Huang, M., Peng, M., Bog, M., Sree, K. S., ... & Zhang, J. (2015). Species distribution, genetic diversity and barcoding in the duckweed family (Lemnaceae). Hydrobiologia, 743(1), 75-87.

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายสลิล ชั้นโรจน์
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr Salil Chanroj

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038 10 3056
โทรสาร 038 10 3018
ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ salil@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544 วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง), ประเทศไทย
พ.ศ. 2554 Ph.D. (Cell Biology and Molecular Genetics) University of Maryland, USA

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

สรีรวิทยาของพืช
ชีววิทยาระดับเซลล์ของพืช
ชีววิทยาของเยื่อหุ้มเซลล์และตัวส่งผ่านสาร
อณูพันธุศาสตร์ของยีสต์และพืช
พฤกษาบำบัด (phytoremediation)

6. ผลงานวิจัย

อัจฉรา แสงจันทร์ อัจฉรา บุตรดี และ**สลิล ชั้นโรจน์** (2559) ผลของสารสกัดหยาบจากอบเชยและส้มแขกต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ไลเปส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. ปีที่ 21 ฉบับที่ 3 หน้า 268-278.

กมลฉัตร อ่องมะลิ อัจฉรา แสงจันทร์ และ**สลิล ชั้นโรจน์** (2560) การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบตะไคร. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. ปีที่ 22 ฉบับพิเศษ หน้า 42-54.

Padmanaban S, Czerny DD, Levin KA, Leydon AR, Su RT, Maugel TK, Zou Y, **Chanroj S**, Cheung AY, Johnson MA and Sze H. (2017) Transporters involved in pH and K^+ homeostasis affect pollen wall formation, male fertility, and embryo development. *Journal of Experimental Botany.* Volume 68, Issue 12, pages 3165–3178.