บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ลำไย (Longan)

ลำไยเป็นพืชวงศ์ Sapindaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan* Lour.;*Euphoria longana* Lam.; *Euphoria Steud*. จัดเป็นไม้ผลเขตกึ่งร้อน สามารถปลูกได้ในพื้นที่สูง 300 ถึง 1,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล การออกดอกในสภาพธรรมชาติต้องการอุณหภูมิ 10-22 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำการสร้างตาดอก ปีที่มีอากาศหนาวเย็นเป็นเวลานาน ลำไยจะออกดอกติดผลดี ถ้าปีใดมีช่วงอากาศหนาวเย็นสั้นหรือมีช่วงอากาศอบอุ่นเข้ามาแทรกลำไยจะไม่ออกดอกหรือออกดอกน้อย ลำไยจึงจัดเป็นไม้ผลยืนต้นที่มีการออกดอกไม่สม่ำเสมอ (พิทยา และพาวิน, 2545)

2.2 สรีรวิทยาของการออกดอกของพืช (สมบุญ, 2548)

เมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม พืชจะมีการพัฒนาไปโดยการสร้างดอก ผล และเมล็ดเพื่อการขยายพันธุ์ต่อไป ซึ่งในขณะที่พืชมีการเปลี่ยนแปลงจากการเจริญทางด้านลำต้น และกิ่งใบ (vegetative phase) ไปเป็นการเจริญทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive phase) ซึ่งเป็นระยะที่พืชสร้างดอกนั้น พืชจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาหลายอย่าง โดยมีทั้งปัจจัยภายใน และปัจจัยภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร ฮอร์โมนพืช รวมทั้ง อายุ และความพร้อมของพืช เมื่อสภาวะแวดล้อมทั้งภายใน และภายนอกเหมาะสม พืชจะมีการสร้างดอกได้ ซึ่งถือว่าดอกเป็นส่วนสำคัญของพืช เป็นจุดเริ่มต้นของการขยายพันธุ์ และการพัฒนาเป็นผล และเมล็ดเพื่อประโยชน์ในการดำรงพันธุ์ การขยายพันธุ์พืชให้สืบทอด และแพร่กระจายต่อไป

2.2.1 กระบวนการเกิดดอก

การเกิดดอกของพืชต้องอาศัยกระบวนการต่างๆ ทางสรีรวิทยาที่ซับซ้อน โดยมีปัจจัยทั้งทางด้านสภาพแวดล้อมภายนอก ตลอดทั้งเกิดจากอิทธิพลภายในต้นพืช เช่น การเจริญเติบโตจากระยะเยาวภาพ (juvenile phase) ไปเป็นระยะการเจริญเต็มวัย (mature phase) จากนั้นเมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสมพืชจะถูกกระตุ้นให้สร้างดอกได้ซึ่งถือว่าเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ อย่างไรก็ตามการชักนำการออกดอกของพืชจะถูกกำหนดโดยพันธุกรรม เช่นเดียวกับกระบวนการสรีรวิทยาอื่นในขณะที่สิ่งแวดล้อมที่จำเพาะจะทำปฏิกิริยาร่วมส่งผลให้พืชสร้างดอก โดยทั่วไปกระบวนการเกิดและพัฒนาของดอกแบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ดังนี้ คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.1 ระยะการเจริญเต็มวัย (Maturation stage)

พืชทั่วไปจะออกดอกได้เมื่อมีการเจริญเต็มวัย (mature) หมายถึง ความพร้อมของอายุของต้นพืชนอกเหนือจากอาหารสะสม และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม พืชจึงตอบสนองต่อปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดดอกได้ ระยะที่พืชโตเต็มวัยจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พันธุ์พืช ฤดูกาล และสภาพแวดล้อม ในไม้ยืนต้นซึ่งมีการเจริญเติบโตทางกิ่งใบสลับกับการออกดอก มักมีระยะเวลาการเจริญเติบโตนานกว่าจะสามารถออกดอกได้ เช่น มะม่วงจะออกดอกหลังจากปลูกด้วยเมล็ด 3-5 ปี และลิ้นจี่ประมาณ 4-5 ปี (Menzel, 1983)

2.2.1.2 ระยะชักนำ (Induction stage)

เป็นการเปลี่ยนแปลงขั้นแรกในการเกิดดอก พืชเริ่มมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นหรือชักนำจากปัจจัยต่างๆที่จะทำให้ระยะกิ่งใบเปลี่ยนเป็นระยะเจริญพันธุ์ เช่น แสง อุณหภูมิ อายุ และความสมบูรณ์ของต้น เป็นระยะที่พืชมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสร้างเมแทบอไลท์ต่างๆภายในเซลล์ เพื่อสังเคราะห์ฮอร์โมนที่กระตุ้นการออกดอก และลำเลียงฮอร์โมนนี้ไปยังส่วนเนื้อเยื่อที่ยอดเพื่อเปลี่ยนเป็นตาดอก ในการชักนำพืชจะถูกกระตุ้นจากปัจจัยที่อาจเหมือนหรือแตกต่างกันออกไป เช่น มะนาวสามารถกระตุ้นการออกดอกได้ด้วยการขาดน้ำ (Chaikiattiyos *et al*., 1994) ลิ้นจี่ ลำไย และมะม่วงสามารถกระตุ้นด้วยอุณหภูมิต่ำ (Batten and McConchie, 1995; Menzel, 1983) หรือกระตุ้นด้วยสารเคมีบางชนิด เป็นต้น (นพดล, 2537; Davenport and Nunez-Elisea, 1997)

2.2.1.3 ระยะการเกิดตาดอก (Initiation stage)

เป็นระยะที่เริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของตายอดที่จะเจริญเป็นดอก (floral primordial) โดยเซลล์เนื้อเยื่อเจริญเริ่มขยายมีลักษณะแบน และกว้างออกเนื่องจากเซลล์ใต้ชั้นเนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis) แบ่งตัวแบบขนานกับผิว ทำให้เกิดปุ่มเล็กๆ เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดดอก (สมบุญ, 2548)

2.2.1.4 ระยะการพัฒนาของดอก (Development stage)

เป็นระยะที่มีการสร้างส่วนประกอบของดอกหลังจากตายอดเปลี่ยนเป็นตาดอกแล้ว ได้แก่ กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรเพศผู้ เกสรเพศเมีย และฐานรองดอก โดยทั่วไปแล้วชั้นของกลีบเลี้ยง (calyx) จะถูกสร้างขึ้นก่อนส่วนประกอบชั้นอื่น ตามด้วยชั้นของกลีบดอก (corolla) ชั้นเกสรเพศผู้ (androecium) และชั้นเกสรเพศเมีย (gynoecium) ส่วนประกอบต่างๆของดอกจะมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเจริญและพัฒนาขึ้นมาจนถึงระยะเวลาดอกบาน (anthesis) ถือเป็นขั้นสุดท้ายของการพัฒนาของดอกในพืช (สมบุญ, 2548)

2.2.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของลำไย

2.2.2.1 ปัจจัยภายนอก

1) แสง ลำไยออกดอกที่ปลายยอดบริเวณที่ได้รับแสง ส่วนกิ่งที่ไม่ได้รับแสงจะออกดอกน้อย ทั้งนี้แสงเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ซึ่งพืชต้องใช้ในการออกดอก นอกจากนี้ลำไยที่มีพุ่มหนาทึบจะออกดอกน้อยกว่าต้นที่มีทรงพุ่มโปร่ง และใบได้รับแสงอย่างทั่วถึง (วิรัตน์, 2543)

2) อุณหภูมิ ปัจจัยสำคัญที่สุดที่ทำให้ลำไยออกดอกได้ คือ ความหนาวเย็นของอากาศเพราะแม้ต้นลำไยจะไม่สมบูรณ์หรือปริมาณฝนมีปานกลางหรือน้อยแต่หากอากาศหนาวเย็นเพียงพอก็ส่งผลให้ลำไยออกดอกได้ ซึ่งคาดว่าอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนภายในของพืช ลำไยออกดอกได้ดีภายหลังผ่านช่วงเวลาของความหนาวเย็น ระยะเวลาที่ได้รับอุณหภูมิต่ำหรือระดับอุณหภูมิที่ได้รับที่สามารถกระตุ้นให้ลำไยออกดอกได้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ พันธุ์ลำไยที่ออกดอกง่ายส่วนใหญ่มักต้องได้รับอุณหภูมิต่ำในช่วงระยะเวลาสั้น และระดับอุณหภูมิไม่ต่ำมาก เช่น พันธุ์ใบดำ พันธุ์ดอ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอก ตั้งแต่ 10 ถึง 20 องศาเซลเซียส (พิทยาและพาวิน, 2545)

2.2.2.2 ปัจจัยภายใน

1) พันธุ์ การออกดอกของลำไยแต่ละพันธุ์มีความยากง่ายแตกต่างกัน เช่น พันธุ์ใบดำ และอีดอ มีนิสัยการออกดอกง่าย (พันธุ์เบา) และค่อนข้างสม่ำเสมอ ส่วนพันธุ์ที่ออกดอกยาก (พันธุ์หนัก) และมักออกดอกเว้นปี คือ พันธุ์แห้ว และเบี้ยวเขียว นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ที่สามารถออกดอกได้มากกว่าหนึ่งครั้งต่อปี คือ พันธุ์เพชรสาคร (พาวินและคณะ, 2543)

2) ความสมบูรณ์ของต้น ลำไยเป็นพืชที่ใช้เวลาตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่นานประมาณ 6 ถึง 7 เดือน ในปีที่ผลดก อาหารจะถูกใช้ไปอย่างมากเพื่อการเจริญเติบโตของผล รวมทั้งต้นลำไยมีระยะในการพักฟื้น และสะสมอาหารน้อย หากการดูแลรักษาไม่ดีพออาจทำให้ต้นลำไยไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสภาพภูมิอากาศไม่เอื้ออำนวยจะส่งผลให้ออกดอกน้อยในปีถัดไป (พาวินและคณะ, 2547)

3) ปริมาณสารฮอร์โมนในพืช มีรายงานถึงการศึกษาปริมาณฮอร์โมนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการออกดอกของลำไย โดย Huang (1996) พบว่าระดับฮอร์โมนภายในต้นลำไยที่เอื้อต่อการชักนำให้เกิดการสร้างตาดอก คือ มีระดับของไซโตไคนิน (isopentenyl adenosine; iPA) สูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่มีปริมาณของ gibberellins (GA_3) และ abscisic acid (ABA) ต่ำ และ Hegele *et al.* (2004a) รายงานว่า ภายหลังราด $KClO_3$ ต้นลำไยมีการออกดอกในวันที่ 17 ในขณะที่ปริมาณไซโตไคนินในปลายยอดเพิ่มสูงขึ้นโดย iAdo/iAde เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 15 หลังการราด $KClO_3$ และ zeatin/ zeatin riboside เพิ่มสูงขึ้นหลังจากนั้นอีก 4 วัน คือในวันที่ 19

2.3 ฮอร์โมนไซโตไคนิน (Cytokinins) (Srivastava, 2001)

นักวิทยาศาสตร์ค้นพบไซโตไคนินในงานวิจัยศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นให้เซลล์พืชแบ่งเซลล์ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยในปี ค.ศ. 1940-1950 ได้แสดงให้เห็นว่ามีสารชนิดหนึ่งเกิดอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพาเรนไคมาในหัวมันฝรั่งกลับกลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญได้ ซึ่งแสดงว่าสารชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์

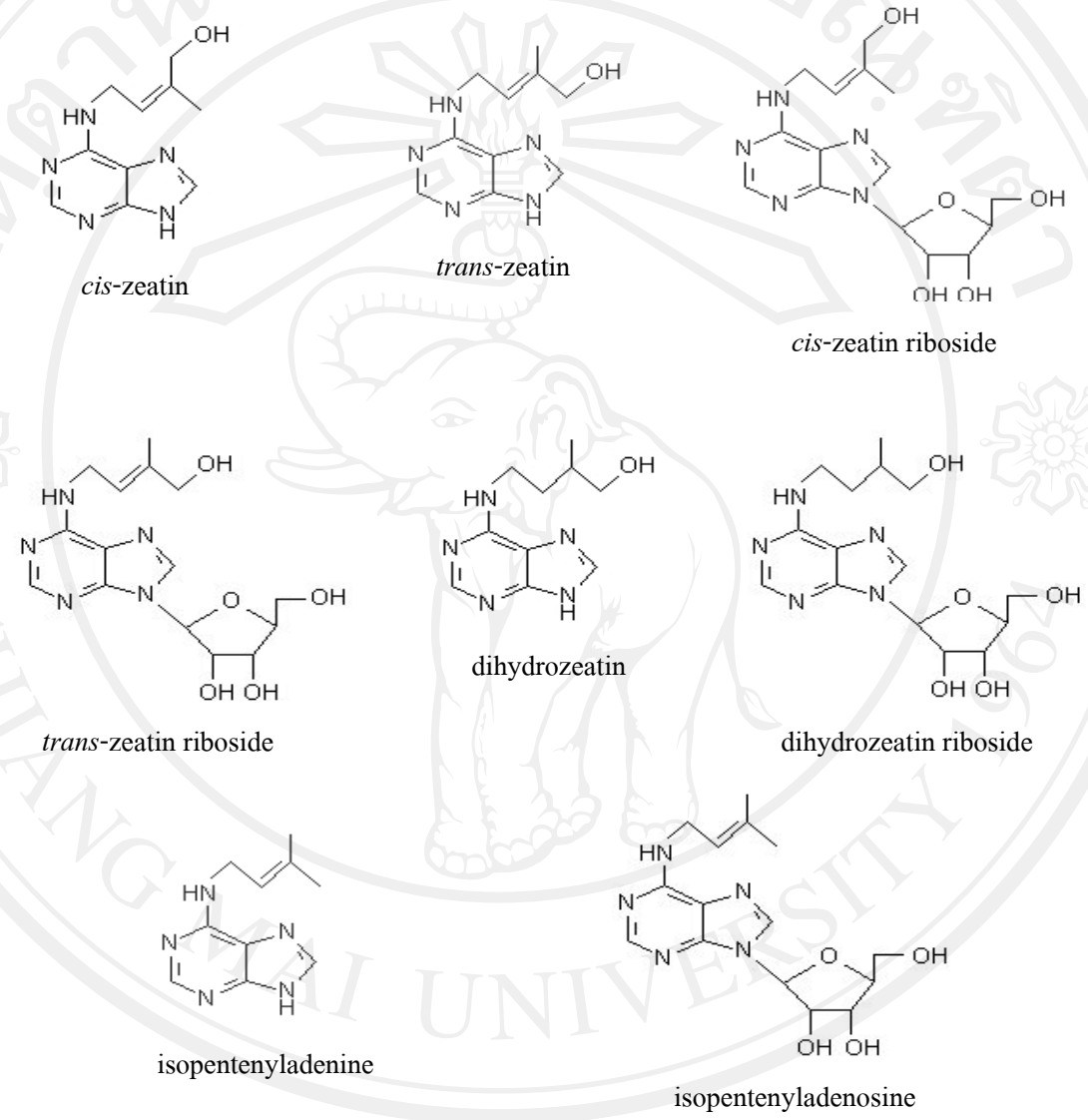
หลังจากนั้น นักวิทยาศาสตร์ค้นพบอิทธิพลของไซโตไคนินต่อกระบวนการสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตพัฒนาอีกหลายอย่าง เช่น การพัฒนาสู่ความตายของใบ การเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร การข่มของตายอดต่อตาข้าง (apical dominance) การสร้างเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด การพัฒนาของดอก การทำลายการพักตัวของตา และการงอกของเมล็ด นอกจากนี้ไซโตไคนินยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการเจริญเติบโต และพัฒนาของพืชที่ได้รับอิทธิพลจากแสง ซึ่งรวมถึงการพัฒนา และเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่ของคลอโรพลาสต์ การขยายขนาดของใบ และใบเลี้ยง เป็นต้น ไซโตไคนินควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์พืชซึ่งมีความสำคัญต่อการเติบโต และพัฒนาของพืช อีกทั้งนักวิทยาศาสตร์จึงใช้การศึกษาการแบ่งเซลล์เป็นวิธีการตรวจสอบฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน

2.3.1 โครงสร้างของไซโตไคนิน

ในธรรมชาติโดยทั่วไปไซโตไคนินจะประกอบด้วย วงแหวนอะดีนีนมี side chain ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอมเกาะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 ของวงแหวนอะดีนีน ไซโตไคนินในธรรมชาตินอกจากซีเอตินแล้ว ยังสามารถสร้างไอโซเพนทีนิลอะดีนีน (isopentenyladenine) และการลดรูปของซีเอตินได้เป็นไดไฮโดรซีเอติน (dihydro zeatin) เนื่องจากส่วน side chain ของซีเอตินมีพันธะคู่เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นไอโซเมอร์ ได้เป็น ซิส-ซีเอติน (*cis*-zeatin) และทรานส์-ซีเอติน (*trans*-zeatin) โครงสร้างของอะดีนีน หากมีน้ำตาลไรโบส (ribose) มาเกาะจะเป็นโครงสร้างของอะดีโนซีน และหากมีน้ำตาลไรโบสที่มีอนุพันธ์ของฟอสเฟตเกาะอยู่ด้วย จะเป็นโครงสร้างของอะดีโนซีน 5' ฟอสเฟต ซึ่งเป็นโครงสร้างปกติที่พบในพืช โดยไรโบสมักจับกับ N ตำแหน่งที่ 9 ของวงแหวนอะดีนีน ดังนั้นในธรรมชาติจะพบอนุพันธ์ของน้ำตาล คือ N^9 riboside และ ribotide (น้ำตาลที่มีกลุ่มของฟอสเฟต) โดยทั่วไปแล้ว การเปลี่ยนสภาพของวงแหวนอะดีนีนจะเป็นผลให้เกิดการลด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพของไซโตไคนิน ดังนั้นอนุพันธ์ที่เป็นไรโบไทด์ หรือไรโบไซด์ (ribotide หรือ riboside) ของไซโตไคนินจึงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าไซโตไคนินอิสระ การมีสารอื่นไปเกาะโมเลกุลของอะดีนีนจะลดคุณสมบัติของไซโตไคนินลง



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไซโตไคนินม
ที่มา : Srivastava (2001); Hopkins and Huner (2004)

2.3.2 การสังเคราะห์ไซโตไคนิน

แหล่งสร้างไซโตไคนินส่วนใหญ่อยู่บริเวณปลายราก และสัญญาณจากยอดสามารถควบคุมการลำเลียงไซโตไคนินจากรากขึ้นมาทางท่อน้ำในรูปของ zeatin ribosides พร้อมกับน้ำและธาตุอาหาร เมื่อ zeatin ribosides ลำเลียงขึ้นมายังใบหรือเมล็ดแล้วจะเปลี่ยนเป็น free base

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

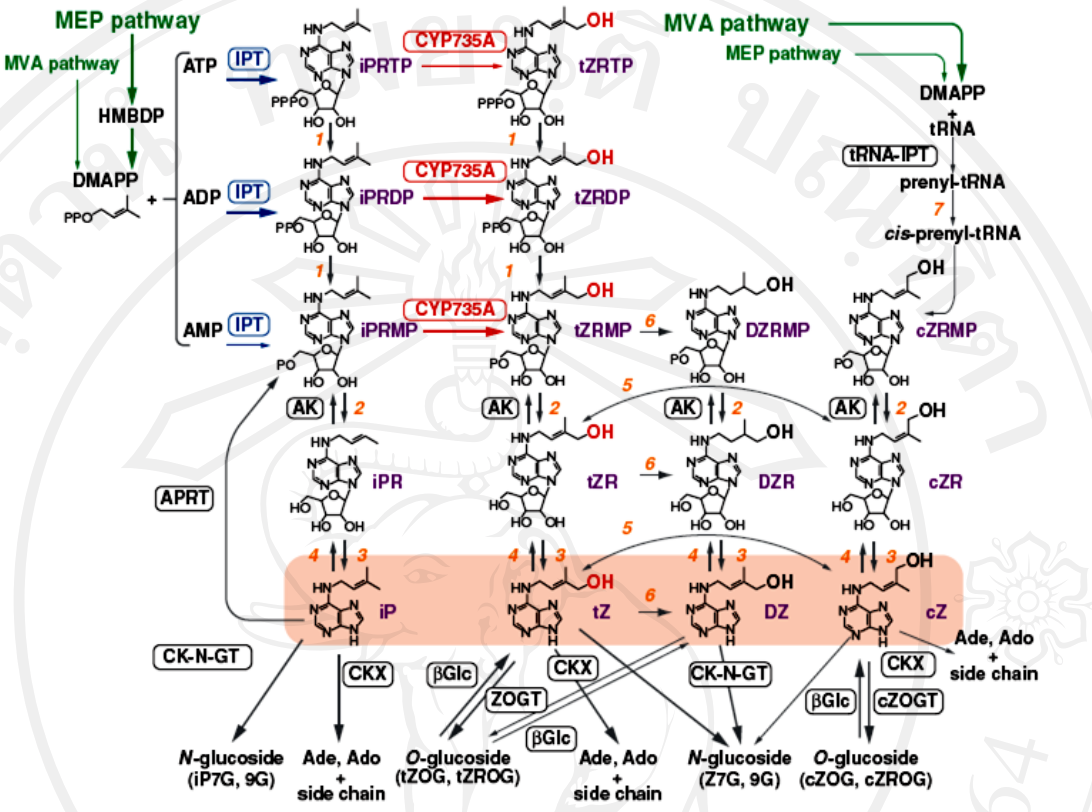
(active form) หรือ glucosides (storage form) ขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญเติบโตของพืช ถ้าอยู่ในระยะใบอ่อนไซโตไคนินจะอยู่ในรูป free base ซึ่งจะควบคุมการแบ่งเซลล์ การพัฒนาของคลอโรพลาสต์ และการขยายขนาดของเซลล์ เมื่อใบมีการเจริญมากขึ้นไซโตไคนินอาจเปลี่ยนรูปไป เช่น เป็น zeatin ribonucleotide หรือ I^6Ade ribonucleotide เป็นต้น และอาจไม่เคลื่อนย้ายออกจากใบอีกเลย หรือในเมล็ดพบไซโตไคนินในรูป glucosides และเมื่อเมล็ดเริ่มงอกจะพบ free cytokinin เพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ cytokinin glucosides ที่ลดลง ไซโตไคนินสามารถเปลี่ยนรูปให้อยู่ในสภาพที่เป็น active form หรือ inactive form ได้ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้พืชหลายชนิดเมื่อปริมาณไซโตไคนินในเซลล์สูง จะชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ cytokinin oxidase เพื่อกำจัดปริมาณของไซโตไคนินให้อยู่ในระดับที่พืชต้องการเพื่อการพัฒนารูปแบบการเจริญเติบโต (morphogenesis) ของพืชอย่างสมบูรณ์

การสังเคราะห์ไซโตไคนินเกิดขึ้นจากการลดลงของ isopentenyl group และ amino group ของอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate) โดยการ hydroxylate ต่อมาพบว่ากลุ่มของไซโตไคนิน เกิดขึ้นบน t-RNA ได้ และเมื่อใช้เมวาโลเนต (mevalonate หรือ MVA) ที่มีสารกัมมันตรังสีจะสามารถไปรวมกับกลุ่มอะดีนีนของ t-RNA เกิดเป็นไดเมทธิลอัลลิล (dimethylally side chain) เกาะด้านข้าง ในเชื้อรา rhizopus นั้น ไดเมทธิลอัลลิล อะดีนีน (dimethylallyl adenine) สามารถเปลี่ยนไปเป็นซีเอตินได้ จึงคาดกันว่าซีเอตินอาจจะเกิดจากการออกซิไดซ์ dimethylallyl adenine (Hopkins and Huner, 2004)

นอกจากนั้น Sakakibara (2006) ยังพบวิถีการสังเคราะห์ไซโตไคนินใน *Arabidopsis* ที่เกิดขึ้นในวิถี methylerythritol phosphate (MEP) และ mevalonate (MVA) (ภาพที่ 3)

Hwang and Sakakibara (2006) กล่าวว่าไซโตไคนินสามารถสังเคราะห์ได้ทั้งในพืชและ Agrobacterium แต่สารตั้งต้นในการสังเคราะห์แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 รูปแบบจำลองวิถีของการสังเคราะห์ไซโตไคนิน ในต้น *Arabidopsis* โดยผ่านวิถี methylerythritol phosphate (MEP) และ mevalonate (MVA) ที่มา: Sakakibara, 2006

2.3.3 การเคลื่อนที่ของไซโตไคนิน

ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของไซโตไคนิน จากการทดลองพบว่าระบบรากเป็นส่วนสำคัญในการส่งไซโตไคนินไปยังใบ และไซโตไคนินยังช่วยป้องกันการเสื่อมสลายของใบก่อนระยะอันสมควร เป็นหลักฐานที่สำคัญที่ชี้ให้เห็นว่า ไซโตไคนินมีการเคลื่อนที่ขึ้นสู่ยอด ยิ่งไปกว่านั้นยังพบไซโตไคนินในท่อน้ำ ซึ่งมาจากระบบรากด้วย ในทางตรงกันข้ามไซโตไคนินซึ่งพบที่ผลซึ่งกำลังเจริญเติบโตไม่เคลื่อนที่ไปส่วนอื่นเลย ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาการใช้ไซโตไคนินจากภายนอก เช่น หากให้ไคเนติน พบว่าการเคลื่อนย้ายจะเกิดช้าหรือไม่เกิด แม้ว่าสารอื่นๆ จะเคลื่อนย้ายออกจากจุดนี้ก็ตาม (Neuman *et al*., 1990) ไซโตไคนินอาจจะเคลื่อนย้ายในรูปที่รวมกับสารอื่นๆ เช่น น้ำตาล (ribosides หรือ glucosides) ซึ่งไซโตไคนินในรูปที่รวมกับน้ำตาลนั้นส่วนใหญ่พบในท่อน้ำท่ออาหาร (Hopkins and Huner, 2004)

ในทศวรรษที่ผ่านมาการทำความเข้าใจในกระบวนการเมแทบอลิซึมไซโตไคนินในพืชชั้นสูงต่อการสังเคราะห์ไซโตไคนินมีความก้าวหน้าอย่างมาก ส่วนใหญ่เป็นการจำแนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระบวนการสำคัญในการแปลรหัสของยีน adenosine phosphate isopentenyltransferase (*IPT*) (Kakimoto, 2001; Takei *et al*., 2001a; Sakamoto *et al*., 2006) tRNA-isopentenyltransferase (tRNA-*IPT*) (Miyawaki *et al*., 2004) ซึ่งการค้นพบเหล่านี้เป็นรูปแบบพื้นฐานสำหรับวิถีการสังเคราะห์ไซโตไคนิน (Sakakibara, 2006; Hirose *et al*., 2008; Kamada - Nobusada and Sakakibara, 2009) อีกทั้งในการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการเมแทบอลิซึม และการลำเลียงระยะไกล (long-distance transport) ของไซโตไคนินระหว่างเซลล์ และเนื้อเยื่อมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยโมเลกุลของสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ เช่น phytohormones mRNA small RNA และโปรตีน ซึ่งจะถูกลำเลียงทั่วทั้งระบบเนื้อเยื่อลำเลียงในพืช (Ruiz-Medrano *et al*., 2001; Mouchel and Leyser, 2007; Liu *et al*., 2009)

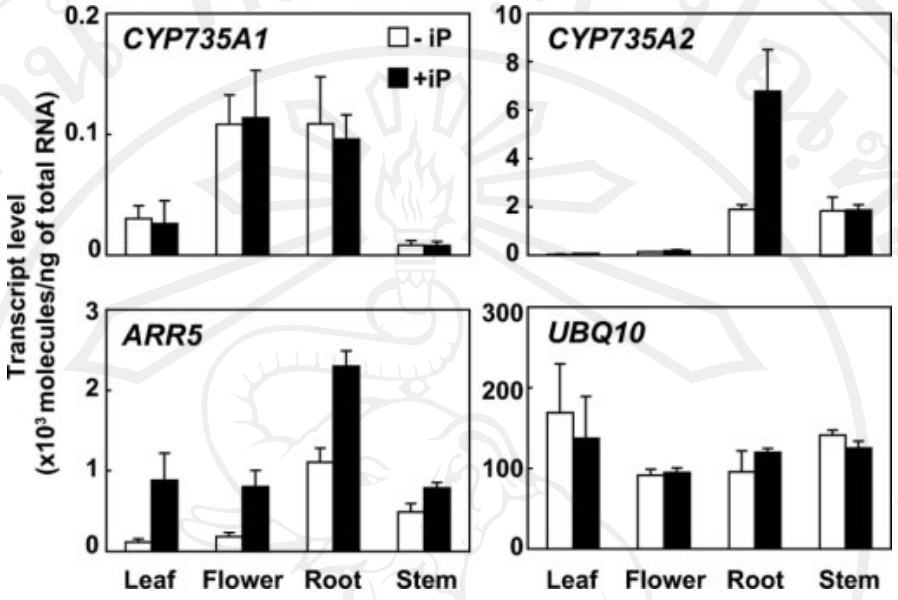
Kakimoto (2001) และ Takei *et al*. (2001a) ได้จำแนกรหัสของยีน *IPT* ในพืช *Arabidopsis* ได้จำนวน 7 ยีน ที่มีความสามารถในการผลิตไซโตไคนินชนิด iP และ *t*Z ในการศึกษาได้อธิบายบทบาทเฉพาะของแต่ละยีน *IPT* ในพืช เช่น *AtIPT3* มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ไซโตไคนินในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในของไนเตรทในราก (Sakakibara, 2006; Miyawaki *et al*., 2004) เช่นเดียวกับ *AtIPT7* ที่เป็นตัวกลางสำคัญในการสังเคราะห์ไซโตไคนินเพื่อรักษาเนื้อเยื่อตายอดใน *Arabidopsis* และการกระตุ้นโดยโปรตีน *KNOX* (Knotted1-like homeobox) (Jasinki *et al*., 2005; Yanai *et al*., 2005)

ในพืชชั้นสูงไซโตไคนินชนิด *t*Z ถูกผลิตขึ้นโดยกระบวนการ hydroxylation ของ iP nucleotide หรือการใช้สารตั้งต้น unknown hydroxylated side-chain (Heyl *et al*., 2006, Sakakibara, 2006) การสังเคราะห์ไซโตไคนินโดยกระบวนการ hydroxylation ของ iP nucleotide นี้ถูกกระตุ้นโดย cytochrome P450 monooxygenase จำนวน 2 เอนไซม์ ใน *Arabidopsis* คือ *CYP735A1* และ *CYP735A2* (Takei *et al*, 2001b)

Takei *et al*. (2004) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Arabidopsis* ในเนื้อเยื่อจำเพาะ และการตอบสนองต่อไซโตไคนินของยีน *CYP735A1* และ *CYP735A2* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยน้ำหรือ iP ความเข้มข้น 5 μM หลังจาก 1 ชั่วโมงทำการสกัด total RNA และวิเคราะห์การสะสมของ mRNA *CYP735A1* *CYP735A2* *ARR5* (ตอบสนองต่อไซโตไคนิน) และ *UBQ10* (ไม่ตอบสนองต่อไซโตไคนิน) โดยวิธี quantitative real time PCR พบว่า *trans*-hydroxylation อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการเคลื่อนย้ายระยะไกลของไซโตไคนินจากรากไปยอดผ่านทางท่อน้ำ การลำเลียงนี้มีบทบาทในการส่งสัญญาณของธาตุไนโตรเจนต่อการสร้างรากพิเศษ (adventitious root) และการแตกตายอด ไซโตไคนินชนิด *t*Z เช่น *t*-ZR เป็นไซโตไคนินที่มีปริมาณมากในท่อน้ำ ดังนั้น *CYP735A* มีการแสดงออกมากที่สุดในราก โดยเฉพาะ *CYP735A2* จะชักนำให้เกิดรากโดยไซโตไคนิน (ภาพที่ 3) ส่วนไซโตไคนินชนิด iP จะมีมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในใบ ดังนั้น *trans*-hydroxylation อาจจะมีส่วนสำคัญสำหรับการแยกชนิด และควบคุมทิศทางการลำเลียงของไซโตไคนินได้



ภาพที่ 3 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Arabidopsis* ในเนื้อเยื่อจำเพาะ และการตอบสนองต่อไซโตไคนินของยีน *CYP735A1* และ *CYP735A2* ที่มา: Takei *et al.* , 2004

2.3.4 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนไซโตไคนินต่อการออกดอกในไม้ผล

การสร้างตาดอกเป็นระยะแรกในการเปลี่ยนการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ไปสู่การเจริญทางด้านสืบพันธุ์ การสร้างตาดอกของพืชสามารถชักนำได้จากหลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความยาววัน หรือ แสง เป็นต้น ซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลของฮอร์โมน ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างตาดอก

ในการศึกษาหลังจากที่ต้นลำไยได้รับสภาพชักนำให้ออกดอก โดยการใช้ $KClO_3$ หรือกระตุ้นด้วยอุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นผลที่ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายฮอร์โมนไซโตไคนินออกจากใบ โดยพบว่าอุณหภูมิต่ำจะเพิ่มการเคลื่อนย้ายของ iP/iPA ร่วมกับ IAA แต่การเคลื่อนย้าย Z/ZR และ GAs จะมีปริมาณค่อนข้างต่ำ (<10 ng) การที่พบปริมาณ iP/iPA มากกว่า Z/ZR ใน exudates ของลำไยอาจเกิดจาก iP/iPA เคลื่อนย้ายออกจากใบไปทางท่ออาหารเพื่อไปยังส่วนปลายยอด (shoot apical meristem) และเนื้อเยื่อเจริญด้านข้าง (lateral meristem) (Srigarm *et al*., 2009) ในช่วงระหว่างการกำเนิดตาดอก (floral bud initiation) ทำให้ปริมาณ iP/iPA ในตายอดเพิ่มขึ้น (Chen *et al*., 1997) เช่นเดียวกับ ณัฐวดี (2545) พบปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินมีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วงก่อนการออกดอก โดยยอดลำไยในกลุ่มที่ได้รับ $KClO_3$ มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินสูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุกสัปดาห์ที่ศึกษา เช่นเดียวกับ Chen *et al.* (1997) ได้ศึกษาปริมาณไซโตไคนินในยอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของลำไยพบว่าปริมาณไซโตไคนินทั้ง Z/ZR และ iP/iPA จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่ลำไยเริ่มมีการสร้างตาดอกในยอดลำไยมีปริมาณมากในช่วง flower bud initiation ในลำไยที่ออกดอกตามธรรมชาติ โดยการชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ แต่ยังไม่สามารถระบุที่มาของแหล่งของไซโตไคนินที่เพิ่มขึ้นในยอดลำไย ซึ่งได้ตั้งสมมุติฐานว่าอาจมาจากรากแล้วเปลี่ยนแปลงรูปที่ใบแล้วจึงเคลื่อนที่ไปสู่ยอด หรือปริมาณไซโตไคนินนั้นได้มาจากการไฮโดรไลท์จากโมเลกุลของไซโตไคนินที่จับกับโมเลกุลอื่น (conjugated form) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่แอกทีฟ (inactive molecule) โดยเฉพาะในรูปของ O-glucoside จากการศึกษาของการเพิ่มปริมาณไซโตไคนินในยอดของลำไยที่ชักนำโดยอุณหภูมิต่ำและการชักนำโดย $KClO_3$ (Hegele *et al*., 2004; Potchanasin *et al*., 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งทั้งรูป Z และ ZR เพิ่มขึ้นมากหลังจากต้นลำไยได้รับ $KClO_3$ หากไม่มีการเพิ่มของปริมาณไซโตไคนิน ต้นลำไยจะไม่ออกดอก (Potchanasin *et al*., 2009; Sringarm *et al*., 2009)

2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิคระดับโมเลกุล (Molecular Technology) ในการจำแนกยีน

2.4.1 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) (Mullis, 1990)

เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น ในหลอดทดลอง ประกอบด้วย ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) เอนไซม์ thermostable DNA polymerase deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) 4 ชนิด (dATP dCTP dGTP และ dTTP) oligonucleotide primer และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ (ภาพที่ 4)

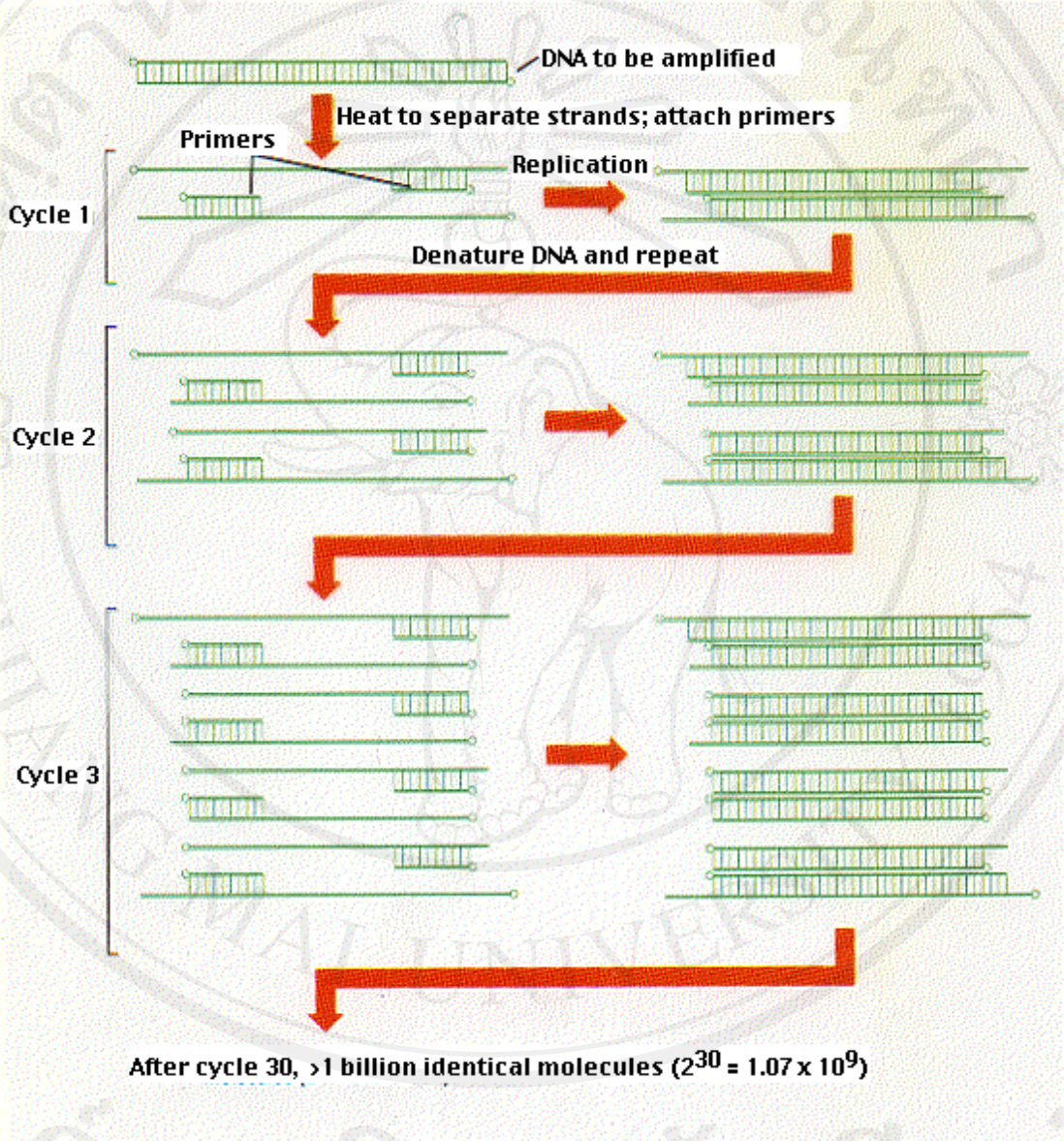
ขั้นที่ 1 Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 2 Primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม คือเป็นลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่จับคู่ได้กับนิวคลีโอไทด์สายเดิม

ขั้นที่ 3 Primer extension (synthesis) เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับ นิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยต้องอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกัน เป็นจำนวน 30-40 รอบ ทำให้ได้ amplified product หรือที่เรียกว่า amplicon เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นล้าน ๆ เท่า (2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา)



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ที่มา: Mullis (1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ผลิตผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (วสันต์และคณะ, 2539)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้ทั่วไป คือ

2.4.2.1 วิธี gel electrophoresis

เป็นการดูผลผลิต PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากผ่านขบวนการอิเล็กโตรโฟรีซีสแล้ว ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลผลิต PCR ที่ทราบขนาดแน่นอน ได้ผลผลิต PCR เพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิด สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้อย่างชัดเจน หากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 เบส นิยมใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่ถ้าหากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 เบส นิยมใช้อะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือใช้เจลอะคริลาไมด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับเป็นตัวกลางในการแยกขนาด

2.4.2.2 Nucleic acid hybridization

ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจน สามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรึงกับแผ่น Nitrocellulose หรือแผ่น Nylon แล้วนำมาทำ Southern hybridize, dot hybridize หรือ Slot hybridize โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี แล้วจึงนำผลไปดูการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตามได้

2.4.2.3 Direct sequencing

ในกรณีที่ต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่ สามารถตรวจหาลำดับเบสจากผลผลิต PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR product) หรือสายเดี่ยว (single stranded PCR product)

2.4.3 เทคนิคชั้นสูงของ PCR (advanced PCR) (จริยาและคณะ, 2540)

ปัจจุบันพบว่า PCR เป็นเทคนิคที่นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายสาขาทั้งการแพทย์ การเกษตร โบราณคดี อุตสาหกรรม และอื่นๆ ปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ที่เพิ่มขึ้นมากจึงเรียกว่า advanced PCR ได้แก่ Multiplex PCR PCR-SSCP และ Nested PCR เป็นต้น ทำให้มีความหลายหลายในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงาน และได้ประโยชน์ยิ่งขึ้น โดยได้มีการพัฒนาเฉพาะเทคนิคพื้นฐาน ตัวอย่าง advanced PCR ได้แก่

2.4.3.1 Multiplex PCR

เป็นเทคนิคการทำ PCR ซึ่งเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันโดยต้องออกแบบไพรเมอร์แต่ละคู่ให้ดีไม่มี complementary กัน และเมื่อนำไปทำ PCR จะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ multiplex PCR ต้องปรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยาเพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุกไพรเมอร์ที่ใส่ลงไปได้เท่ากัน multiplex PCR ใช้สำหรับการวิเคราะห์ microsatellites และ SNPs (Hayden *et al*., 2008)

2.4.3.2 PCR-SSCP

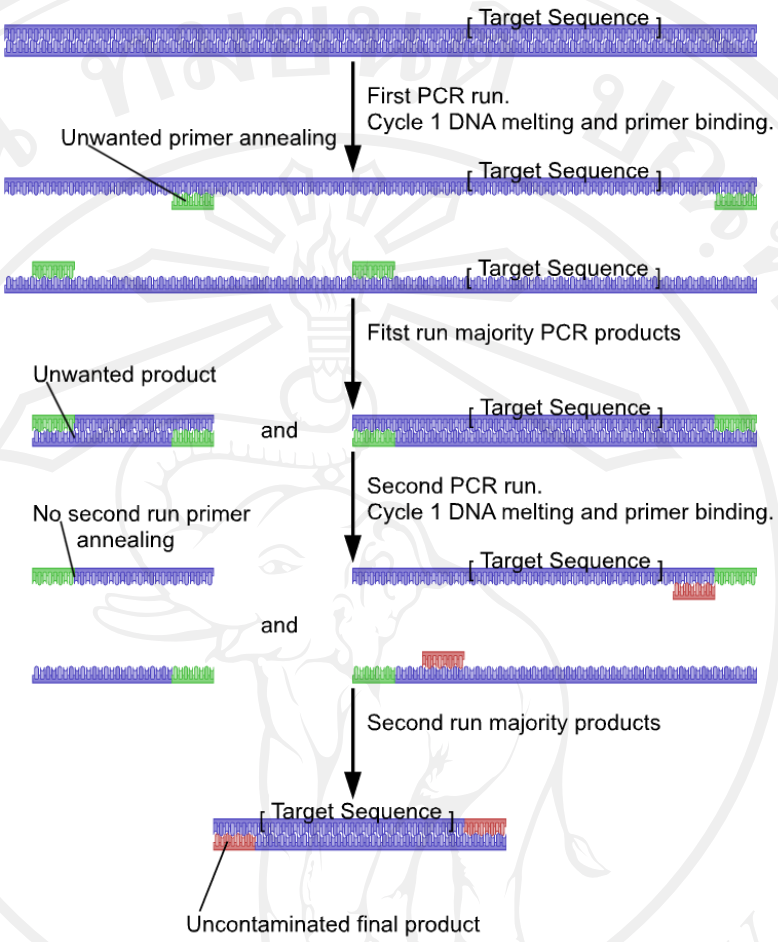
เป็นเทคนิคที่รวมเอาหลักการของ single-strand conformation polymorphism (SSCP) ซึ่งใช้ตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเพียง 1 bp (base pair) ในสายสั้นๆ เข้ากับวิธีของ PCR ดังนั้นการทำ PCR-SSCP นั้นจะเริ่มจากการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียง 1 bp ในสายดีเอ็นเอประมาณ 100-500 bp ด้วยวิธี simple PCR จากนั้นนำเอาผลผลิต PCR มาทำ SSCP โดยอาศัยหลักการทำให้ผลผลิต PCR เสียสภาพให้เป็น single strand แล้วจึงนำเอาดีเอ็นเอนี้ไปแยกด้วย non-denaturing gel เพื่อดูการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ถ้าดีเอ็นเอสายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเพียง 1 bp จะทำให้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลแตกต่างไปจากเดิม ส่วนใหญ่การทำ SSCP นั้นมักจะใช้วิธีการติดฉลากผลผลิต PCR และแยกบน 5 เปอร์เซ็นต์ non-denaturing polyacrylamide gel แล้วทำ ^{32}P autoradiography

2.4.3.3 Nested PCR

เป็นเทคนิค PCR ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัย PCR 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่แรกจะใช้ในตอน PCR ขั้นตอนแรก และไพรเมอร์คู่แรกจะอยู่รอบนอกของ DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า DNA เป้าหมายแต่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิต PCR ขั้นตอนที่ 1 ไปทำ PCR ขั้นตอนที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ซึ่งออกแบบสำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจากไพรเมอร์คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่ 2 นั้นอาจทำปฏิกิริยา 25-30 รอบ จะได้ผลผลิต DNA เป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามที่ต้องการ (ภาพที่ 5)

ข้อดีของเทคนิค nested PCR คือ มีความไวเพิ่มขึ้น เพราะเท่ากับการทำ PCR 2 ครั้ง ผลผลิต DNA ที่ได้มีจำนวนมากขึ้นย่อมมีโอกาสถูกตรวจพบมากขึ้น nested PCR มีความจำเพาะสูงขึ้น เพราะ DNA เป้าหมายต้องมีลำดับเบสที่ complementary กับไพรเมอร์ถึง 2 คู่ จึงจะถูกปริมาณได้ผลผลิต DNA ที่ได้นี้ถือว่ามีความจำเพาะสูงขึ้นมาก ไม่จำเป็นต้องพิสูจน์โดยการทำ hybridization กับ probe จำเพาะเหมือนกับ PCR ทั่วไป (สุรินทร์, 2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 แผนภาพ Nested PCR (ที่มา: Wheeler, 2005)

2.4.4 การสังเคราะห์ cDNA โดยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความไวสูงมากที่สุดในการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (gene expression) ในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) หรือเนื้อเยื่อตัวอย่างที่มีปริมาณอาร์เอ็นเอนำรหัส (messenger ribonucleic acid; mRNA) เพียงเล็กน้อย และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของยีน (Rymerson *et al*., 1995)

RT-PCR เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่หนึ่งเป็นปฏิกิริยา Reverse transcription และขั้นตอนที่สองเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนหลักประกอบไปด้วยการสกัด mRNA ซึ่งยังคงเสถียรน้อยจึงต้องเพิ่มความระมัดระวังเป็นพิเศษในการเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อให้ mRNA ยังคงสภาพดั้งเดิมโดยป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ และอาจถูกทำลายด้วยเอนไซม์ RNase ที่ปนเปื้อนเข้ามา (Dunican, 1997) ตัวอย่าง mRNA ที่สกัดได้แล้วต้องการนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนควรจะต้องอยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์ คือ เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสต้องสามารถตรวจพบแถบของ small (18S) และ large (28S) subunit ribosomal RNAs แล้วทำการสังเคราะห์ย้อนกลับจาก mRNA ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากลักษณะ mRNA ของยูคาริโอตที่มีปลาย 3' polyadenylation (poly-A) ดังนั้นจึงใช้ anchored primer ที่ออกแบบให้จับกับปลาย 3' ของ mRNA ไพรเมอร์ที่ใช้คือ oligo d(T) หลังจากนั้นจึงนำ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ anchored primer ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการทำ reverse transcription ร่วมกับ arbitrary primer มีนิวคลีโอไทด์ 10-13 bp การที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ทำให้การทำปฏิกิริยากับ cDNA ต้นแบบเป็นไปอย่างสุ่ม (nonspecific) เมื่อนำ cDNA ที่ได้ไปแยกขนาด ถ้าหากแถบที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่างมีขนาดใกล้เคียงกัน สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนได้ง่ายและเลือกแถบ cDNA ที่แตกต่างกันไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เทคนิคนี้จึงเป็นการประยุกต์ใช้ mRNA เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการแสดงออกมากเกินไปหรือน้อยเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในสภาวะปกติ ทั้งนี้นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเอนไซม์ reverse transcriptase ให้มีคุณสมบัติที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง และออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของยีนเป้าหมายเพื่อส่งเสริมให้ได้ปริมาณ RT-PCR products มากที่สุด

2.4.5 การนำเวคเตอร์ลูกผสม (recombinant vector) เข้าสู่ host cells

การนำยีน หรือดีเอ็นเอ มาเชื่อมกับเวคเตอร์ เช่น พลาสมิด โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์จำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดดีเอ็นเอแล้วใช้เอ็นไซม์ไลเกส (ligase) เชื่อมดีเอ็นเอให้เข้ากับเวคเตอร์เรียกว่า เวคเตอร์ลูกผสม (recombinant vector)

การนำ recombinant vector เข้าสู่เซลล์ผู้เจ้าบ้าน เช่น *E. coli* โดยทำให้เซลล์เจ้าบ้านอยู่ในสภาพที่พร้อมหรือเหมาะสม เรียกว่า เซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) ซึ่งสามารถกระทำได้ด้วยการใช้สารเคมีเช่น $CaCl_2$ $MgCl_2$ $CoCl_2$ KCl dimethysulfoxide ที่อุณหภูมิ 0-42 องศาเซลเซียส หรือใช้ไฟฟ้าเพื่อให้เกิดรูหรือช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นก็นำ recombinant vector เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน เรียกกระบวนการนี้ว่า ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) และเรียกเซลล์ผู้ที่มี recombinant vector นี้ว่า ทรานสฟอร์แมนต์ (transformant) เมื่อ transformant มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนก็เท่ากับว่ายีนหรือ DNA ที่ใส่เข้าไปนั้นเพิ่มจำนวนขึ้นด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.6 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ (identification of cells that recombination DNA molecules)

เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector มาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตนั้น (genomic DNA) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีจำนวนมาก หรือเป็นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์มาจาก mRNA ซึ่งมีหลายชนิดเช่นเดียวกัน เมื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้วจึงมีเซลล์จำนวนมากและแต่ละเซลล์ได้รับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เรียกว่าเป็นห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA library) จึงมีความจำเป็นต้องเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอ หรือยีนที่ต้องการด้วยวิธีตรวจสอบ phenotype คัดเลือกด้วยวิธีการทางอิมมูโนเคมีโดยใช้แอนติบอดี หรือเลือกโดยการทำโคโลนีไฮบริไดเซชัน (colony hybridization)

พลาสมิดเป็นพาหะดีเอ็นเอที่ใช้งานสะดวกที่สุด และใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการโคลนยีน ในปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตได้ผลิตพลาสมิดชนิดต่างๆ ที่ใช้กับ *E. coli* ออกมาเป็นจำนวนมาก พลาสมิดสามารถแยกสกัดได้ง่ายมีประสิทธิภาพสูงในการถูกทรานสฟอร์ม (transformed) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน มียีนเครื่องหมายหลายชนิด และใช้งานได้สะดวกสำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

การทำโคโลนีไฮบริไดเซชันเป็นการวิเคราะห์ยีน หรือดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ต้องการ หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิส เปรียบเทียบขนาดของพลาสมิด และพลาสมิดที่มีชิ้นของดีเอ็นเออยู่ (พลาสมิดลูกผสม) (Alcamo, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved