



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Physic Nut (*Jatropha curcas* L.)

นามผู้วิจัย นายวิชา สิงห์ลอ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทน์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงห์ลอจี้ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่สนุ่นดำ (*Jatropha curcas* L.)

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Physic Nut (*Jatropha curcas* L.)

โดย

นายวิชา สิงห์ลอ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิชา สิ่งหล่อ 2555: การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่สนับดำ (*Jatropha curcas* L.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 76 หน้า

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสนับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล โดยศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และแคลลัสสนับดำ การทดสอบความเข้มข้นของเชื้อ ($OD_{600}=1$) จากการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่างๆ ได้แก่ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 และ 1:100 ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ 10 20 30 และ 40 นาที และระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 1 2 3 และ 4 วัน พบว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังจากการถ่ายยีน และวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สนับดำ คือการใช้สัดส่วนการเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อที่ 1:20 ระยะเวลาปลูกเชื้อ 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน โดยให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการอื่นที่ทดสอบ

การถ่ายยีน EPSPs เข้าสู่แคลลัสสนับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่มียีน EPSPs เป็นยีนคัดเลือก โดยนำปัจจัยที่เหมาะสมจากการศึกษาเบื้องต้นมาใช้ในการถ่ายยีน พบว่า มีแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่มีสารไกลโฟเสตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9 โคลน จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตมาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแคลลัสที่มียีน EPSPs จำนวน 3 โคลน ซึ่งเมื่อนำมาขึ้นย่นผลการมีอยู่ของยีน EPSPs ที่ถูกถ่ายเข้าไปในแคลลัสด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization พบว่าเป็นยีน EPSPs จริง

Wicha Singlo 2012: Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 76 pages.

Agrobacterium-mediated transformation into physic nut callus was optimized using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 contained plasmid pCAM-EPSPs 1304 that has β -glucuronidase (*gus*) gene as a reporter gene. Cefotaxime at the concentration of 100-400 mg/l was tested for the optimal concentration that could successfully eliminate *A. tumefaciens*. The effects of transformation parameters were studied including: concentration of *A. tumefaciens* at the dilution ratio ($OD_{600}=1$: culture medium) of 1:0, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50 and 1:100; inoculation periods of 10, 20, 30 and 40 min and co-cultivation periods of 1, 2, 3 and 4 days. The result demonstrated that 200 mg/l cefotaxime could successfully eliminate *A. tumefaciens* and callus still able to regenerate. The transformation procedure using dilution of *A. tumefaciens* at 1:20, 30 mins inoculation period and co-cultivated for 2 days yielded the highest percentage of transformations verified by a GUS histochemical assay and significantly different from other treatments.

Transformation of *EPSPs* gene into calli of physic nut using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 containing the pCAM-EPSPs 1304 plasmid with glyphosate resistance (*EPSPs*) gene as a selectable marker. The optimized factors that from studied earlier were used for gene transfer showed a 9 clones of callus could survived on selective medium containing glyphosate concentration of 1 mM but only 3 callus of them showed PCR positive for *EPSPs* gene. The Southern PCR hybridization also confirmed the presence of *EPSPs* gene.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม กรรมการที่ปรึกษาร่วมเป็นอย่างสูงยิ่ง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาวิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ เสมอมา ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้อง ๆ รวมทั้งทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

วิชา สิงห์ลอ

ตุลาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	57
สรุป	57
ข้อเสนอแนะ	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	59
ภาคผนวก	73
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	76

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนยอดเฉลี่ยของสปูดำพันธุ์โคราชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดนาน 6 สัปดาห์	41
2 เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสี และระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัส ตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 โดยใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน ที่ระดับการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วนต่าง ๆ	46
3 เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสี และระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัส ตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1:20 และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน ที่ระยะเวลาการปลูกเชื้อต่าง ๆ	47
4 เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสี และระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัส ตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1:20 และใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 30 นาที ที่ระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อต่าง ๆ	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 จำนวนแคลลัสสปู่คำที่ผ่านการถ่ายยีนที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก ตายระหว่างการชักนำให้เกิดยอด เจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรชักนำยอด และที่ตรวจพบยีน <i>EPSPs</i>	75

สารบัญภาพ

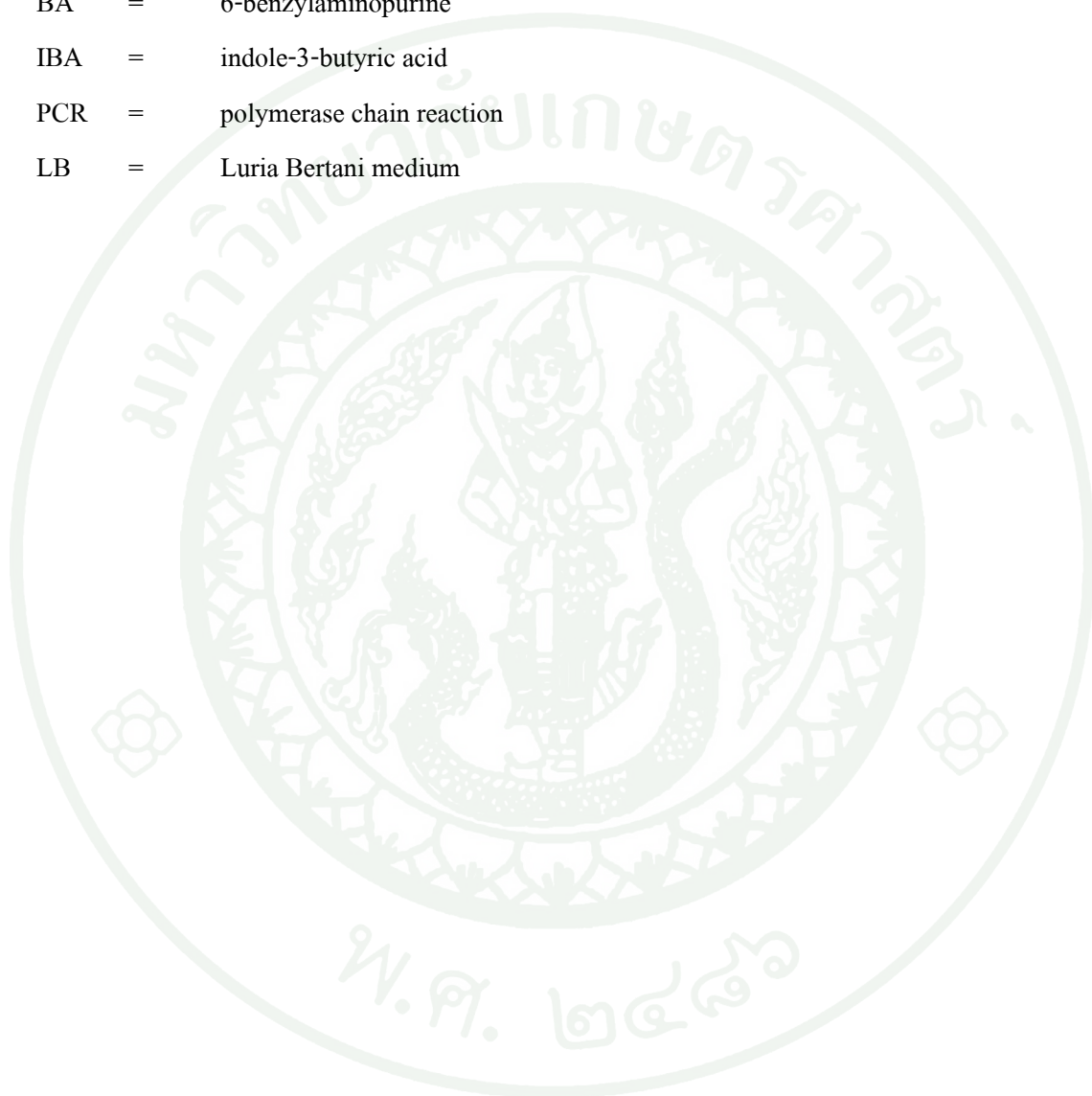
ภาพที่	หน้า
1 ตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยาภายในพืชของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวนโดย EPSPs	15
2 ส่วนประกอบ ของพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304	20
3 เกณฑ์การให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน จากการตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay	26
4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับคัพพันธุ์โคราชในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมล ต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	34
5 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ภายหลังการปลูกเชื้อลงบนแคลลัสสับคัพ และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 2 สัปดาห์	37
6 การเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 หลังจากปลูกเชื้อ ลงบนแคลลัสสับคัพ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่เติม สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์	38
7 การเจริญเติบโตของแคลลัสสับคัพพันธุ์โคราช เมื่อเพาะเลี้ยงบน อาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมล ต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
8	การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสสปู่คำพันธุ์โคราชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดนาน 6 สัปดาห์	40
9	การเจริญเติบโตของแคลลัสสปู่คำพันธุ์โคราช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารไกลโฟเสท ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์	43
10	ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปู่คำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304	52
11	ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน EPSPs จากแคลลัสสปู่คำที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ก) และ Southern PCR hybridization (ข) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน EPSPs ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส โดยทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน EPSPs	56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

TDZ	=	thidiazuron
BA	=	6-benzylaminopurine
IBA	=	indole-3-butyric acid
PCR	=	polymerase chain reaction
LB	=	Luria Bertani medium



การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Physic Nut

(*Jatropha curcas* L.)

คำนำ

สบู่ดำ (physic nut) เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae สามารถนำเมล็ดมาบีบน้ำมันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์มากมาย อาทิเช่น ผลิตเครื่องสำอางค์ สบู่ และเทียนไข เป็นต้น (Duke, 1988) น้ำมันจากสบู่ดำยังสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่หมุนช้าได้ (Openshaw, 2000) ในประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสบู่ดำเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงเช่นกัน แต่ยังไม่มีการผลิตเป็นอุตสาหกรรม เนื่องจากสบู่ดำให้ผลผลิตต่ำกว่าปาล์มน้ำมัน (ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์, 2550) แต่ข้อได้เปรียบของสบู่ดำเมื่อเทียบกับพืชพลังงานชีวภาพอื่นๆ คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดี ขยายพันธุ์ง่าย และวิธีการสกัดน้ำมันสามารถทำได้ง่าย และจากการที่น้ำมันสบู่ดำไม่สามารถนำมาบริโภคได้ จึงไม่มีการแข่งขันในการผลิตเป็นอาหาร เช่นในพืชชนิดอื่น (Soham *et al.*, 2009) ดังนั้นในสถานะที่โลกต้องการพืชพลังงานทดแทนเนื่องจากประสบปัญหาน้ำมันขาดแคลน และมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ สบู่ดำจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญและมีศักยภาพในการผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล (Openshaw, 2000) สำหรับสถานการณ์ความต้องการใช้น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว บี 5 ในประเทศไทย พบว่ามีความต้องการใช้มากขึ้นโดยมีปริมาณการใช้เพิ่มขึ้นจาก 627,450 พันลิตร ในปี พ.ศ. 2550 เป็น 8,155,781 พันลิตร ในปี พ.ศ. 2552 (กระทรวงพลังงาน, 2552)

แม้สบู่ดำจะเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและต้องการการบำรุงรักษาน้อย แต่ยังพบปัญหาในการปลูกสบู่ดำ คือ ปัญหาเรื่องโรค ได้แก่ เชื้อราที่พบในช่วงที่อากาศร้อนและแห้ง ปัญหาเรื่องแมลงศัตรูพืช ได้แก่ กลุ่มแมลงปากดูด เช่น เพลี้ยหอย เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยจักจั่น ไรขาว และปัญหาเรื่องวัชพืช ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญต่อการปลูกสบู่ดำ โดยต้นทุนการผลิตสบู่ดำในด้านการจัดการวัชพืชคิดเป็น 2.94 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนการปลูกสบู่ดำต่อไร่ต่อปี ซึ่งวัชพืชจัดเป็นศัตรูพืชที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนา ตลอดจนส่งผลกระทบต่อผลผลิตของสบู่ดำ อีกทั้งยัง

เป็นสาเหตุทางอ้อมของการเข้าทำลายของโรคและแมลง เนื่องจากวัชพืชสามารถเป็นได้ทั้งแหล่งอาหารและที่อยู่อาศัยของโรคและแมลงที่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืชที่ปลูกได้ (อภิรัฐ, 2552) ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้สารกำจัดวัชพืชเพื่อควบคุมและกำจัดวัชพืชภายในแปลงปลูก ถึงแม้ว่าสับดูดาจะเป็นพืชที่มีความทนทานต่อการใช้สารกำจัดวัชพืช แต่สารกำจัดวัชพืชที่ใช้หลังงอกส่วนใหญ่มักเป็นแบบไม่เลือกทำลาย ทำให้เมื่อสัมผัสกับต้นสับดูดาที่ยังเล็กอยู่มีผลทำให้ต้นสับดูดาชะงักการเจริญเติบโตหรืออาจตายได้

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์สับดูดาให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น ๆ จะช่วยให้การจัดการวัชพืชมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ต้นทุนในการผลิต สับดูดาลดลง และเป็นการเพิ่มผลผลิตของสับดูดาให้สูงขึ้นด้วย แต่เนื่องจากในธรรมชาติไม่สามารถหาพันธุ์สับดูดาที่สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ ดังนั้น การถ่ายยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชเข้าสู่สับดูดาจึงนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาสับดูดาให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สับดูดำพันธุ์โคราชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย
2. ถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่เซลล์สับดูดำพันธุ์โคราชเพื่อสร้างสับดูดำสายพันธุ์ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท



ตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง ทรงพุ่มมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร ยอดและใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียว ลำต้นส่วนที่มีอายุน้อยมีสีเขียว ผิวเรียบ อวบน้ำ เปราะหักได้ง่ายเพราะเป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแกน เมื่อสบู่ดำมีอายุมากขึ้น โคนต้นมีสีน้ำตาลอมเทา และเริ่มแตกทรงพุ่มเมื่อลำต้นมีความสูงจากระดับพื้นดินประมาณ 12 เซนติเมตร โดยมีกิ่งแขนงเจริญออกทางด้านข้าง เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ขึ้นได้ในที่ดอนและดินลูกรัง แต่ไม่ทนสภาพน้ำท่วมขัง (กรีก, 2549)

ใบของสบู่ดำมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปหัวใจกว้างถึงรูปโล่คล้าย ๆ ใบฝ้าย ใบพุดตานหรือใบละหุ่ง แต่หนากว่าเพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบเรียบ มีรอยหยักเว้าเป็นพู 5 พู พูข้างปลายมน พูปลายหรือพูกลางรูปหัวใจปลายแหลม การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบร่างแห (palmately netted venation) ขนาดของใบมีความกว้างประมาณ 18 เซนติเมตร มีความยาวประมาณ 16 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 24 เซนติเมตร สบู่ดำมักทิ้งใบในช่วงฤดูร้อน ถ้าแห้งแล้งมากจะทิ้งใบทั้งต้น (กรีก, 2549)

ดอกของสบู่ดำออกบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ลักษณะเป็นช่อกระจุกช้อน (compound dichasia) ออกเป็นคู่ ๆ ช่อยาวถึง 12 เซนติเมตร ก้านช่อยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ดอกย่อยแยกเพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่แยกกัน แต่อยู่ภายในช่อเดียวกัน ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกรูปไข่ แกมขอบขนาน สีเหลืองแกมเขียว กว้าง 1.5 มิลลิเมตร ยาว 3 มิลลิเมตร โดยประมาณ ปลายกลม ด้านในมีขนยาวห่าง มีต่อมน้ำหวานที่โคนกลีบด้านใน เกสรเพศผู้มี 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงนอกแยกจากกัน วงในเชื่อมติดกัน อับเรณูยาว 1.5 มิลลิเมตร สีเหลือง ดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้อยู่กลางของช่อย่อย กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ลักษณะอื่นคล้ายดอกเพศผู้ กลีบดอกรูปขอบขนานแกมรี สีเขียวอ่อน มีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 10 อัน สีขาว รังไข่รูปกระสวยมี 3 พู ปลายก้านมียอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 2 แฉก อัตราส่วนของดอกเพศผู้ต่อดอกเพศเมียประมาณ 7 ต่อ 1 ปริมาณดอกย่อยประมาณ 70-100 ดอกต่อช่อ แต่จะติดผล 7-15 ผลเท่านั้น (กรีก, 2549)

ผลของสับดูคำเป็นผลค่อนข้างป้อมหรือรูปกระสวย กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร ลักษณะเป็นแบบเปลือกแข็ง (nut) มี 3 พู ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเมื่อแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลแห้งที่ยังติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก แต่เมื่อผลร่วงลงสู่พื้นดิน อาจแตกได้ ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือ 2.6 กรัม ผลเมื่อแกะผนังด้านนอก (exocarp) และผนังชั้นกลาง (mesocarp) ออก จะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดไว้ภายใน หนึ่งผลมีจำนวนเมล็ด 2-3 เมล็ด (กรีก, 2549)

เมล็ดของสับดูคำมีรูปร่างป้อมยาว (oblong) รูปทรงกระสวยแกมขอบขนานแบน กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1.7 เซนติเมตร โดยประมาณ เปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ จัดเป็นพวกมีเชื้อหุ้มเมล็ด (albuminous seed) โดยมีเยื่อ albumin อยู่ภายใน เป็นที่เก็บสะสมน้ำมัน (oil) และสารเคอร์ซิน (curcin) ส่วนของเนื้อใน (endosperm) และคัพภะ (embryo) มีสีขาว แต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.6 กรัม (กรีก, 2549)

ประโยชน์ของสับดูคำ

ประโยชน์ที่สำคัญอย่างหนึ่งของสับดูคำคือน้ำมันที่สกัดได้สามารถนำมาใช้แทนน้ำมันหล่อลื่น สบู่ เทียนไข และที่สำคัญ สามารถนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันดีเซล เพียงใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้นกรองก็สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลหมุนช้าได้ โดยไม่ต้องผสมกับน้ำมันชนิดอื่นแต่อย่างใด และยังไม่ก่อให้เกิดยางเหนียวติดแหวนและถูกสูบเหมือนน้ำมันพืชชนิดอื่น (ทวีศักดิ์, 2548) อย่างไรก็ตามน้ำมันจากสับดูคำมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลมากและมีคุณภาพของการเป็นเชื้อเพลิงต่ำหรือมีค่าซีเทนต่ำ จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลหมุนเร็ว ในการใช้น้ำมันสกัดที่ได้จากสับดูคำเพื่อทำเป็นเชื้อเพลิงจึงจำเป็นต้องนำน้ำมันที่สกัดได้มาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ด้วยเอทานอลหรือเมทานอล โดยใช้โซเดียมหรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้ได้สารประกอบเอสเทอร์ที่มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล เมทิลเอสเทอร์ที่ได้มีความหนืดที่ต่ำกว่าน้ำมันสับดูคำเริ่มต้นที่อุณหภูมิเดียวกันประมาณ 10 เท่า และมีสมบัติทางเคมีฟิสิกส์อยู่ในช่วงมาตรฐานของไบโอดีเซล ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันสับดูคำเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซล (กล้าณรงค์ และคณะ, 2548)

เกษตรกรทั่วไปนิยมปลูกสับปะรดเป็นรั้วล้อมรอบพื้นที่การเกษตรที่สำคัญเพื่อป้องกัน โรคกระป๋อง แผล และแคะ เข้าไปทำลายพืชผล ต้นสับปะรดยังปลดปล่อยกรดไฮโดรไซยานิก(hydrocyanic) ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเขียวออกมาขับไล่สัตว์และแมลงบางชนิดไม่ให้เข้ามาใกล้บริเวณนั้น นอกจากนี้การปลูกสับปะรดยังเป็นการช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมคือ ช่วยลดปัญหาการกัดเซาะของหน้าดินจากลม และน้ำ เนื่องจากรากของสับปะรดช่วยยึดเกาะกับผิวดิน ช่วยลดอัตราการไหลของน้ำลง มีผลให้ดินสามารถดูดซับน้ำไว้ได้มากขึ้นเมื่อเกิดปัญหาน้ำท่วม สามารถปลูกเป็นแนวป้องกันลมร้อนในฤดูแล้ง ลดการระเหยของน้ำในดินได้ (ประ โยชน์, 2549)

นอกจากมนุษย์จะได้รับประโยชน์จากสับปะรดด้านการเกษตรและเชิงป่าไม้แล้ว ยังได้รับประโยชน์จากการนำส่วนต่าง ๆ ของต้นสับปะรดมาใช้เป็นสมุนไพร และผลิตภัณฑ์ที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่น ในด้านพืชสมุนไพร ได้แก่ หมอแผนโบราณของอินเดียจะใช้เถาของสับปะรดผสมกับเถาของต้น Blumea ทาเพื่อบรรเทาความเจ็บปวดในกรณีมีเลือดออกจากริดสีดวงทวารหนัก หรือนำผสมผสมดังกล่าวผสมกับน้ำมันมะสดทาแก้โรคผิวหนัง และยังมีรายงานว่า สารที่สกัดจากก้านใบด้วยน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (cytopathic effect) ของเชื้อ HIV ได้โดยมีพิษต่ำ เปลือกของต้นสับปะรดมีสารแทนนิน ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ ลดอาการปวดท้อง ใบใช้เป็นยาถอนพิษแก้ตัวร้อน แก้พิษตานซาง ลื่นเป็นฝ้า ปากและลิ้นเปื่อยพุพอง ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* *Bacillus* และ *Micrococcus* ได้ ซึ่งมีฤทธิ์อยู่ได้ถึง 6 ชั่วโมง เมล็ดของสับปะรดยังใช้เป็นยาระบาย หรือยาถ่ายอย่างแรง และแก้ปวดฟัน (ประ โยชน์, 2549)

สำหรับภูมิปัญญาท้องถิ่นที่นำส่วนต่าง ๆ ของต้นสับปะรดมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ การนำก้าน กากเมล็ดสับปะรด ใช้ทำเป็นปุ๋ยพืชสดและปุ๋ยอินทรีย์ ใบ เปลือกและรากของสับปะรดใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสีธรรมชาติเพื่อใช้ย้อม หรือเคลือบเครื่องหนัง กากสับปะรดที่ผ่านกระบวนการกำจัดพิษด้วยความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมีสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้น้ำยางของสับปะรดยังมีคุณสมบัติคล้ายชะแล็ก (shellac) ใช้เคลือบเงา ทำน้ำมันทาสี หรือใช้ทำหมึกพิมพ์ (ประ โยชน์, 2549)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Jatropha*

การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตต้นสับปะรด และพืชในสกุล *Jatropha* ได้มีการวิจัยและพัฒนาในหลายประเทศ เช่น อินเดีย บราซิล และออสเตรเลีย เป็นต้น

(Da Câmara Machado *et al.*, 1997; Pletsch and Charlwood, 1997; Rajore *et al.*, 2002) เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตต้นสับดูดำในปริมาณมากตามต้องการและสามารถนำออกปลูกได้ในสภาพธรรมชาติ โดยมีการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ส่วนของใบ ก้านใบ ลำต้น ส่วนใต้ใบเลี้ยง ส่วนเหนือใบเลี้ยง ก้านช่อดอก เอ็มบริโอ ราก และส่วนข้อ ซึ่งมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสับดูดำโดยสังเขป ดังนี้

นันทน์ภัส และคณะ (2549) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับดูดำ โดยใช้ชิ้นส่วนก้านใบ ลำดับที่ 2 3 และ 4 จากยอด เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 และการชักนำให้เกิดยอดในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 โดยมีรอบการเพาะเลี้ยง 30 วัน เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นบนอาหารแ่งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.44-17.76 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.049-9.80 ไมโครโมลาร์ พบว่า สารควบคุมการเติบโตที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดจากก้านใบคือ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ โดยแคลลัสจากก้านใบข้อที่ 2 มีการพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุด คือ 70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือก้านใบของข้อที่ 3 และ 4 มีการพัฒนาเป็นยอด 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ศิริวรรณ และรุ่งทิพย์ (2550) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสับดูดำ โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด ตาข้าง ใบอ่อน ก้านใบ และ ไฮโปคอติล เพาะเลี้ยงบนอาหารแ่งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.045-0.45 ไมโครโมลาร์) พบว่าเนื้อเยื่อชิ้นส่วนต่าง ๆ สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี โดยแคลลัสที่ได้เป็นแบบ embryogenic callus ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแ่งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโพรลีน (proline) ความเข้มข้น 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเคซีน (casein hydrolysate) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส

นุชจรี (2551) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับดูดำ พบว่า ก้านใบอ่อนสับดูดำพันธุ์โคราชลำดับที่ 2-3 จากปลายยอด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแ่งสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงชนิดเดียว ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาหารแ่งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิด direct shoot มากที่สุดเฉลี่ย 10 ยอดต่อชิ้น แต่อาหารแ่งสูตร MS ที่

เดิม TDZ ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิด direct shoot น้อยที่สุดเฉลี่ย 2.9 ยอดต่อชิ้น และเมื่อตัดยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสับดูในอาหารแข็งสูตร MS ที่เดิม TDZ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เดิม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดเหล่านั้นสามารถยืดยาวพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ โดยมีความยาวตั้งแต่ 0.92-2.14 และ 1.32-2.34 เซนติเมตร ตามลำดับ

Sujatha and Mukta (1996) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของ *J. curcas* พบว่า การใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เดิม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ไฮโปคอติลและก้านใบเกิดยอดได้ดีที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ zeatin ความเข้มข้น 9.12 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ไฮโปคอติลเกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถชักนำให้ก้านใบเกิดยอดได้ ส่วนการใช้ Kinetin ความเข้มข้น 4.65 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ ชักนำให้ก้านใบเกิดยอดได้ 55 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถชักนำให้ไฮโปคอติลเกิดยอดได้

สำหรับการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของ *J. curcas* ให้พัฒนาเป็นยอด Sujatha and Mukta (1996) รายงานว่า การใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เดิม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้แคลลัสจากไฮโปคอติลพัฒนาเป็นยอดได้ 43 เปอร์เซ็นต์ การใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เดิม BA ความเข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้แคลลัสจากก้านใบพัฒนาเป็นยอดได้ 67 เปอร์เซ็นต์ และการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เดิม BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้แคลลัสจากชิ้นส่วนก้านใบจากข้อที่ 3 จากยอด พัฒนาเป็นยอดได้ 67 เปอร์เซ็นต์

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนในพืชเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ โดยเซลล์พืชที่ได้รับยีนเข้าไป และยอมรับยีนนั้นให้เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมสามารถแสดงลักษณะของยีนนั้นออกมาได้ เรียกพืชนั้นว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) ประโยชน์ของการถ่ายยีนที่สำคัญ คือสามารถสร้างพืชพันธุ์ใหม่โดยยังคงลักษณะเดิมที่ดีเอาไว้ การสร้างพืชดัดแปลง

พันธุกรรมมีวัตถุประสงค์หลายด้าน เช่น สร้างพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา ยืดอายุการใช้งานและการเก็บรักษาผัก ผลไม้ และดอกไม้ ผลิตภัณฑ์ไม้ประดับและพืชอาหารให้มีผลผลิตและคุณภาพตามต้องการ (กรรชิต, 2547)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ การโคลนยีนและสร้างพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีน การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชนั้น ๆ การคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน และการพัฒนาเป็นต้นของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี โดยสามารถแบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรงด้วยวิธีการต่าง ๆ ซึ่ง มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดพืช และชนิดของเนื้อเยื่อเป้าหมาย สำหรับการถ่ายยีนโดยตรงนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1.1 การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี เป็นการถ่ายยีนโดยผ่านโปรโตพลาสต์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์พืช แล้วบ่มรวมกับสารละลายดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยนิยมใช้สารละลาย polyethylene glycol (PEG) ร่วมด้วย ให้มีความเข้มข้นประมาณ 40% สำหรับกลไกการทำงานที่แท้จริงสันนิษฐานว่า PEG จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง ซึ่งจะมีโอกาสทำให้ดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังอาจใช้สารละลาย PEG ร่วมกับการใช้ความร้อนระยะสั้น ๆ อย่างทันทีทันใด (heat shock) โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายดีเอ็นเอและ PEG มาใส่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายมาใส่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที (สุรินทร์ และคณะ, 2539)

1.2 การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) เป็นวิธีการทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งได้นำมาประยุกต์ใช้กับการถ่ายยีนในพืช กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าต่ำ ใช้เวลานาน (long pulse) และระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าสูง แต่ใช้เวลาสั้นกว่า (short pulse) (สุรินทร์ และคณะ, 2539)

1.3 การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) สามารถทำได้ในระดับเซลล์หรือโปรโตพลาสต์ของพืชเท่านั้น โดยการใช้เข็มฉีดยาดีเอ็นเอเข้าสู่โปรโตพลาสต์โดยตรง แต่เนื่องจาก

เซลล์พืชมีเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) และสารประกอบที่เป็นพิษต่าง ๆ ในการฉีดจึงต้องระมัดระวังไม่ให้ฉีดถูกเอนไซม์ไฮโดรเลสซึ่งจะทำให้เอนไซม์แตกและเซลล์ตายได้ จึงควรเลือกเซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่ริมขอบเซลล์ในทิศทางของเข็มที่ฉีด หรือทำให้เซลล์เกาะติดอยู่กับที่โดยใช้ micromanipulator หรือ holding pipette หรือทำให้เซลล์เกาะกับแก้วโดยเคลือบด้วยสาร poly L-lysine หรือมีการฝังโปรโตพลาสต์ไว้ใน agarose แล้วจึงฉีดดีเอ็นเอเข้าไปในตำแหน่งที่เหมาะสม (สุรินทร์ และคณะ, 2539) โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ มีความเที่ยงตรงสูง สามารถใช้กับกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กได้ และอาจใช้ได้กับ somatic หรือ zygotic embryo ได้ แต่มีข้อเสียคือ อุปกรณ์และเครื่องมือมีราคาแพง วิธีการมีความซับซ้อน และต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญสูง (สนธิชัย, 2543)

1.4 การถ่ายยีนโดย silicon carbide fiber-mediated gene transfer เนื่องจาก silicon carbide (SiC) เป็นสารประกอบที่เป็นผลึกแข็ง ไม่ละลายน้ำ มีรูปร่างยาวประมาณ 10-80 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 0.6 ไมโครเมตร เมื่อใส่ผลึกนี้ร่วมกับดีเอ็นเอที่ต้องการลงในเซลล์แขวนลอย แล้วเขย่าแรง ๆ ผลึกจะแทงทะลุผ่านผนังเซลล์และเป็นช่องทางให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่เข้าไปภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังใช้ embryo หรือ somatic embryo เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายได้อีกด้วย สำหรับข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อเสียคือ silicon carbide เป็นสารก่อให้เกิดโรคมะเร็งกับระบบทางเดินหายใจ (สนธิชัย, 2543)

1.5 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment หรือ microprojectile bombardment) เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีอื่น ๆ เช่น การถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* ทำได้ยากในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Cheng *et al.*, 1997) เทคนิคการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคนี้นี้เป็นวิธีการที่ใช้อนุภาคโลหะขนาดเล็ก ซึ่งมีขนาด 0.6-4.0 ไมโครเมตร โดยทั่วไปนิยมใช้อนุภาคทังสเตนหรือทองคำ นำมาเคลือบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หรือพลาสมิดที่ต้องการถ่ายเข้าสู่พืช แล้วยิงด้วยความเร็วสูง อนุภาคเหล่านั้นจะนำยีนเข้าสู่พืช และเกิดการเชื่อมต่อยีนเป้าหมายกับดีเอ็นเอในจีโนมของพืช

ในระยะแรกมีการสร้างเครื่องยิงอนุภาคเริ่มจากงานประดิษฐ์ของ Klein *et al.* (1987) ที่มหาวิทยาลัยคอร์เนล สหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถพัฒนาเครื่องยิงอนุภาคโดยใช้แรงดันจากการระเบิดของดินปืนให้สามารถถ่ายยีนเข้าสู่พืช และมีการแสดงออกของยีนอย่างถาวร (stable

transformation) ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องยิงอนุภาคขึ้นอีกหลายรูปแบบ ซึ่งส่วนใหญ่จะแตกต่างกันในการใช้แหล่งของแรงดันที่ใช้ขับเคลื่อนอนุภาค ได้แก่ การใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง (McCabe *et al.*, 1988) ก๊าซไนโตรเจน (Morikawa *et al.*, 1989) ก๊าซฮีเลียม (Takenchi *et al.*, 1992) และใช้แรงดันอากาศ (Oard, 1993) เครื่องยิงอนุภาคที่ผลิตเป็นการค้าครั้งแรก คือเครื่องที่ใช้แรงดันจากกระสุนดินดำที่ชื่อ Biolistic PDS-1000 (Dupont Company, Willington, DE) แต่ต่อมาได้พัฒนาเครื่องรุ่นใหม่ที่ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม และทำให้สภาพภายในตู้ยังเป็นสุญญากาศขณะยิงในชื่อ PDS-1000/HE Biolistic® particle delivery system หรือ Biorad gun ซึ่งประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าเครื่องที่ใช้กระสุนดินดำประมาณ 5-10 เท่า (Kikkent, 1993) ข้อเสียที่สำคัญของการถ่ายยีนโดยเทคนิคนี้คือ ต้นพืชที่ได้จากการถ่ายยีนมักมีจำนวนซ้ำของชุดยีนที่ถ่ายเข้าไปหลายชุด (multiple copy number) ทำให้ยีนเป้าหมายมักไม่แสดงออก (Finnegan and MacElroy, 1994; Dai *et al.*, 2001) และยังทำให้การถ่ายทอดของยีนเป้าหมายไปยังรุ่นลูกไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Spencer *et al.*, 1992)

Joshi *et al.* (2011) ถ่ายยีนเข้าสู่ embryo axes ของสับปะรดด้วยเทคนิค microprojectile bombardment โดยใช้อนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก เพื่อทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนคือ ขนาดของอนุภาค แรงดันของก๊าซฮีเลียม และระยะห่างระหว่างหัวยิงและเป้าหมาย พบว่า การใช้อนุภาคขนาด 1.6 ไมโครเมตร แรงดันของก๊าซฮีเลียม 1550 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และระยะห่างระหว่างหัวยิงกับเป้าหมาย 3 เซนติเมตร ให้ผลการแสดงออกแบบชั่วคราว (transient expression) ของยีน *gus* สูงที่สุด แต่พบว่าเนื้อเยื่อทุกชิ้นตายในระหว่างการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin ส่วนการใช้อนุภาคขนาด 1 ไมโครเมตร แรงดันของก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และระยะห่างระหว่างหัวยิงกับเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ให้ผลของประสิทธิภาพการถ่ายยีนภายหลังจากการคัดเลือกสูงที่สุดคือ 44.7%

2. การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ (vector mediated gene transfer) การถ่ายยีนโดยวิธีนี้เป็นการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยพาหะ พาหะที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางคือ เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียดินประเภทแกรมลบ รูปร่างเป็นรูปแท่ง และเป็นสาเหตุของโรคปุ่มปม (crown gall disease) ในพืชใบเลี้ยงคู่ *A. tumefaciens* สามารถถ่ายส่วนของ T-DNA (transferred DNA) ซึ่งอยู่บน Ti-plasmid (tumor-inducing plasmid) เข้าสู่เซลล์พืช โดยจะเข้าแทรกในจีโนมของพืชและสามารถแสดงออกได้ในพืช (Horsch *et al.*, 1985) มีการใช้ประโยชน์

จากแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อการถ่ายยีนโดยตัดยีนที่ชักนำให้เกิดปุ่มปมในพืชออก แล้วแทนที่ด้วยยีนที่ต้องการเข้าไปในส่วนของ T-DNA

สายพันธุ์ดั้งเดิมของเชื้อนี้ไม่สามารถก่อโรคกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ แต่ในปัจจุบันการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวางทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง ต้นพืชถ่ายยีนที่ได้มีจำนวนชุดของยีนน้อย สามารถส่งถ่ายยีนที่มีขนาดใหญ่ได้ และมีค่าใช้จ่ายน้อย (Hiei *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1997) สำหรับในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวแม้จะไม่ใช่พืชอาศัยของ *A. tumefaciens* แต่ได้มีการศึกษาและพัฒนาให้สามารถใช้เทคนิคนี้ถ่ายยีนให้กับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ได้แก่ กล้วย (May *et al.*, 1995) ข้าว (Rashid *et al.*, 1996; Uze *et al.*, 1997) ข้าวโพด (Ishida *et al.*, 1996; Frame *et al.*, 2002) ข้าวสาลี (Cheng *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003) ข้าวไรย์ (Popelka and Altpeter, 2003) อ้อย (Arenicibia *et al.*, 1998; Manickavasagam *et al.*, 2004) ข้าวฟ่าง (Gao *et al.*, 2005) และข้าวบาร์เลย์ (Kumlehn *et al.*, 2006) เป็นต้น

กระบวนการส่งถ่าย T-DNA จาก *A. tumefaciens* ไปยังเซลล์พืชเป้าหมายขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัยตามขั้นตอนคือ การที่เชื้อเข้าไปจดจำหรือยึดเกาะกับผิวของเซลล์พืชบริเวณที่เกิดบาดแผล การชักนำให้เกิดการทำงานของยีนภายในเซลล์แบคทีเรีย การผลิตสารต่าง ๆ ที่ช่วยในการส่งถ่ายชิ้น T-DNA การส่งถ่ายชิ้น T-DNA และการเข้าไปแทรกตัวของ T-DNA เข้าไปในจีโนมของพืช (De la Riva *et al.*, 1998) ทั้งนี้ความสำเร็จและประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ อาทิเช่น อายุและชนิดของเนื้อเยื่อพืช สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ ระยะเวลาการปลูกเชื้อและเลี้ยงร่วมกับเชื้อ pH ของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังจากการถ่ายยีน เป็นต้น (Mannan *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2010)

Li *et al.* (2007) เปรียบเทียบการถ่ายยีนเข้าสู่แผ่นใบเลี้ยงสับค้ำโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCambia 1301 ซึ่งประกอบด้วยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin (*hpt* gene) และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว พบว่าการปลูกเชื้อด้วยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงกว่า โดยปรากฏจุดสีน้ำเงินมากกว่า 20 จุด บนเนื้อเยื่อแต่ละชิ้น

ต่างจากการปลูกเชื้อด้วยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่ปรากฏจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยเพียง 10 จุดบนเนื้อเยื่อแต่ละชิ้น

Trivedi *et al.* (2009) ถ่ายยีนเข้าใบและใบเลี้ยงสับดูดาโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA 1301 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ acetosyringone ที่เติมลงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสสำหรับการเลี้ยงร่วมกับเชื้อในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 50 100 200 และ 400 ไมโครโมลาร์ พบว่าการใช้ acetosyringone ทุกความเข้มข้นให้ผลของประสิทธิภาพการถ่ายยีนไม่แตกต่างกัน

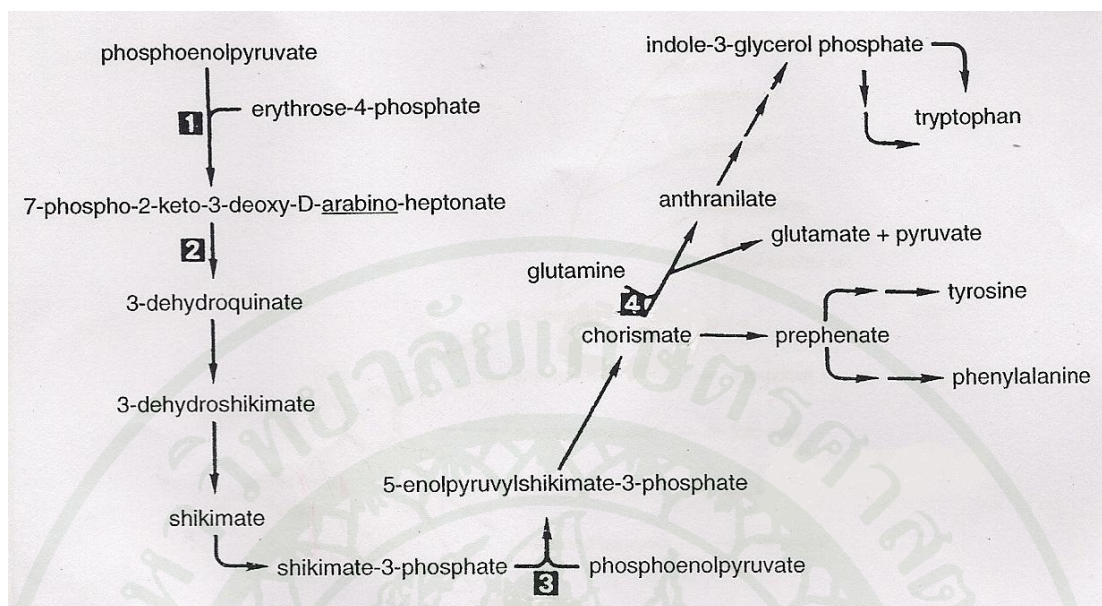
Zong *et al.* (2010) ถ่ายยีน *Lateral shoot-Inducing Factor (LIF)* เข้าสู่เนื้อเยื่อใบอ่อนของสับดูดาโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121-LIF โดยศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีน ได้แก่ ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ ระยะเวลาปลูกเชื้อ ระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ ความเข้มข้นของ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ และความเข้มข้นของ kanamycin สำหรับคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้สารแขวนลอยเชื้อที่ความเข้มข้น $OD_{600} = 0.1$ ปลูกเชื่อนาน 40 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื่อนาน 5 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการถ่ายยีน ซึ่งให้ผลการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* และอัตราการรอดชีวิตของชิ้นเนื้อเยื่อสูงที่สุด ส่วนการใช้ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน และการใช้ kanamycin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการใช้คัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

ไกลโฟเสท เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีการพัฒนาขึ้นมาในปี ค.ศ. 1972 โดย Franz แห่งบริษัท มอนซานโต สารในกลุ่มนี้เริ่มมีการนำมาใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs (5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ phenylalanine, tryptophan และ tyrosine (ทศพล, 2545)

ไกลโคเฟสเฟต เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลาย ที่มีกลไกหรือตำแหน่งของปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส แต่จะทำหน้าที่ในคลอโรพลาสต์ แม้ว่าจะทำปฏิกิริยาในไซโตพลาสซึมได้ (ทศพล, 2545) ซึ่ง Nafziger *et al.* (1984) และ Coggings (1986) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อไกลโคเฟสเฟตเข้าสู่พืชจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPs) ใน shikimic acids pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ aromatic amino acids ชนิดต่างๆ ขั้นตอนที่สารไกลโคเฟสเฟตเข้าไปยับยั้งการสร้าง aromatic amino acids ใน shikimic acids pathway นั้น สารจะเข้าไปยับยั้งตำแหน่งที่ 1 2 3 และ 4 (ภาพที่ 1) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ เอนไซม์ phosphor-2-keto-3-deoxy-heptonate aldolase เอนไซม์ dehydroquinate synthase เอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPs) และเอนไซม์ anthranilate synthase โดยในตำแหน่งที่ 1 2 และ 4 จะถูกยับยั้งโดยไกลโคเฟสเฟตเพียงเล็กน้อย ไม่รุนแรงเหมือนในตำแหน่งที่ 3 จึงทำให้มีปริมาณของ shikimate ถูกสะสมอยู่ภายในต้นพืชมาก ดังนั้นการสังเคราะห์สารในกลุ่ม aromatic amino acid จะไม่เกิดขึ้น (Duke, 1985)

ทศพล (2545) อธิบายว่า ลักษณะอาการที่พืชได้รับพิษ หลังจากที่ได้รับสารภายใน 4-7 วัน จะมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชทันที โดยที่พืชจะแสดงลักษณะอาการ chlorosis และ necrosis ในวัชพืชวงษ์หญ้าที่อ่อนแอจะแสดงอาการได้รับพิษภายใน 10-20 วัน ลักษณะอาการ chlorosis จะเกิดขึ้นก่อน ทำให้ใบที่ยังไม่แก่เต็มที่ และจุดเจริญจะถูกทำลายไป ไกลโคเฟสเฟตจะดูดซึมเข้าสู่พืชโดยผ่านทาง cuticle สารไกลโคเฟสเฟตที่อยู่ในรูปเกลือจะสามารถเข้าสู่พืชได้เร็วกว่าสารที่อยู่ในรูปกรด ไกลโคเฟสเฟตจะเคลื่อนย้ายจากบริเวณส่วนของใบไปสู่เนื้อเยื่อ metabolic sink แบบ symplast (โดยเฉพาะส่วนที่อยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ และเนื้อเยื่อที่สะสมอาหาร) สารจะเคลื่อนย้ายไปสะสมอยู่ที่บริเวณที่อยู่ใต้ดิน (underground tissue) ใบที่ยังไม่แก่เต็มที่และเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) ดังนั้นอวัยวะของพืชที่ทำหน้าที่สะสมอาหาร เช่น หัว เหง้า และไหล จึงมีสารไกลโคเฟสเฟตไปสะสมอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เป็นผลทำให้สามารถควบคุมวัชพืชอายุข้ามปีได้ดี



ภาพที่ 1 ตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยาภายในพืชของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวนโดย EPSPs (Duke, 1985)

- 1 = เอนไซม์ phospho-2-keto-3-deoxy-heptonate aldolase
- 2 = เอนไซม์ dehydroquinate synthase
- 3 = เอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPs)
- 4 = เอนไซม์ anthranilate synthase

การพัฒนาพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทอย่างกว้างขวาง โดยพืชที่ประสบความสำเร็จและถูกนำมาใช้เป็นการค้าแล้ว ได้แก่ ถั่วเหลือง (Roundup Ready[®] soybean) คาโนล่า ฝ้าย และข้าวโพด เป็นต้น (Howe *et al.* 2002) ซึ่งการผลิตพืชให้มีความต้านทานหรือทนทานต่อสารไกลโฟเสทนั้นสามารถทำได้หลายวิธี อาทิเช่น การใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม การใช้เทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์

Suwanketnikom *et al.* (1992) ทดสอบต้นถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) ที่สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสทในสภาพโรงเรือน โดยฉีดพ่นไกลโฟเสทในอัตรา 0.5 กิโลกรัมสารออก

ฤทธิ์ต่อเฮกเตอร์ แล้วบันทึกความสูงและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเหลืองหลังจากให้สารกำจัดวัชพืช 2 สัปดาห์ พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ดอยคำ และ S.J.5 สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสทได้สูงที่สุด ส่วนพันธุ์ 8416-7 และ 8418-4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสทได้ปานกลาง ส่วนพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ S.J.4 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสารไกลโฟเสท นอกจากนี้ยังได้นำถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการทนทานต่อสารไกลโฟเสทในสภาพห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} โมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นจึงย้ายเซลล์ที่มีชีวิตไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารไกลโฟเสทเป็นเวลา 14 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แขวนลอย จึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้นเท่าเดิม และศึกษาการตอบสนองของเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ พบว่าเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองทุกสายพันธุ์มีการปรับตัวเพื่อให้ทนทานต่อสารไกลโฟเสทอย่างช้า ๆ แต่มีข้อสังเกตคือเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ S.J.4 สามารถปรับตัวได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ

Widholm *et al.* (2001) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ในเซลล์แขวนลอยพืช 3 ชนิด ได้แก่ อัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L.) สายพันธุ์เซลล์ Alf ถั่วเหลือง (*Glycine max* L. (Merr.)) สายพันธุ์ W82 และยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) สายพันธุ์ AB และ H155-6 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชทั้ง 3 ชนิด ในอาหารที่เติมไกลโฟเสท ซึ่งจะเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสทขึ้นเรื่อย ๆ ในการเปลี่ยนอาหารแต่ละครั้งจนถึงระดับที่เซลล์พืชสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 35 มิลลิโมลาร์ โดยบันทึกผล เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของไกลโฟเสทที่ทำให้เซลล์แขวนลอยพืชตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่สามารถต้านทานต่อไกลโฟเสท แล้วนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ EPSPS โดยการตรวจสอบการปลดปล่อย inorganic phosphate โดยเทคนิค malachite green dye assay (Forlani *et al.*, 1994) พบว่าอัลฟัลฟาและถั่วเหลืองที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ EPSPS มากกว่าปกติ 62 และ 21 เท่า ตามลำดับ และยาสูบมีกิจกรรมของเอนไซม์ EPSPS สูงมากกว่า 800 เท่า เมื่อเทียบกับยาสูบปกติ ซึ่งการตรวจสอบจำนวน copy ของยีน EPSPS โดยเทคนิค southern hybridization และจำนวน copy ของ mRNA โดยเทคนิค northern hybridization พบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ต้านทานต่อสารไกลโฟเสทของพืชทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าการที่เซลล์พืชมีกิจกรรมของเอนไซม์ EPSPS เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณของยีน EPSPS นั้นเอง

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตยังสามารถทำได้โดยชักนำให้พืชนั้น ๆ เกิดการกลายพันธุ์ เช่น Lee *et al.* (2008) ชักนำให้หญ้าญี่ปุ่น (*Zoysia japonica*) ที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา 50-70 เกรย์ แล้วจึงคัดเลือกหญ้าญี่ปุ่นที่สามารถต้านทานต่อสารไกลโฟเสตได้ เพื่อนำมาใช้ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นต้านทานเปรียบเทียบกับต้นปกติ พบว่าค่า electrolyte leakage (EL) malonaldehyde (MDA) และปริมาณ proline เพิ่มขึ้น ขณะที่ pigment ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารไกลโฟเสต

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้พืชสามารถสร้างเอนไซม์ EPSPS เพิ่มขึ้นโดยใช้ strong promoter หรือการส่งถ่ายยีนจากแบคทีเรีย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิดที่มียีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ EPSPS อีกรูปแบบหนึ่ง คือ CP4-EPSPS ซึ่งเอนไซม์ในรูปแบบนี้จะไม่ถูกยับยั้งโดยสารไกลโฟเสต เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน EPSPS ไป 1 ตำแหน่ง จากเบส C ไปเป็น G ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Glycine (Gly) ไปเป็น Alanine (Ala) ทำให้สารไกลโฟเสตไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ดังกล่าวได้ พืชจึงสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวนได้ตามปกติ และเจริญเติบโตมีชีวิตรอดต่อไปได้เมื่อได้รับสารไกลโฟเสต (Mulwa *et al.*, 2006; Sundar and Sakthivel, 2008)

Zhou *et al.* (1995) พัฒนาระบบคัดเลือกเพื่อใช้สำหรับคัดเลือกข้าวสาลีที่ทนทานต่อสารไกลโฟเสต ซึ่งใช้ยีน CP4 EPSPS และ GOX เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก โดยนำคัพภะอ่อนของข้าวสาลีสายพันธุ์ Bobwhite ที่ถูกส่งถ่ายพลาสมิดที่มียีน CP4 EPSPS GOX และ gus ด้วยวิธียิงอนุภาค หลังจากถ่ายยีน 1 สัปดาห์ จึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมไกลโฟเสตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 9-12 สัปดาห์ จากนั้นจึงชักนำให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ และคัดเลือกต้นที่สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสตได้ โดยยืนยันผลการแสดงออกของยีน CP4 EPSPS และ GOX ด้วยเทคนิค ELISA และใช้เทคนิค Southern blot analysis เพื่อตรวจสอบการเข้าไปแทรกตัวของยีนในจีโนมพืชและการถ่ายทอดยีนไปยังพืชรุ่นต่อไป ซึ่งพบว่ายีน CP4 EPSPS และ GOX มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกและใช้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการใช้เป็นระบบคัดเลือกข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีนอื่น ๆ ต่อไป

Akbarzadeh *et al.* (2010) พัฒนา binary vector สำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *Agrobacterium* เพื่อให้มีความปลอดภัยทางชีวภาพมากขึ้น โดยงดการนำยีนต้านทานสารปฏิชีวนะมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก แต่ได้นำยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชมาใส่แทน ซึ่ง binary vector

ใหม่ (pSA101) สร้างขึ้นมาจาก fragment จากแหล่งต่าง ๆ มาประกอบเข้าด้วยกันโดยอาศัยเทคนิค SOEing PCR ประกอบด้วย intron ของ *Hsp70* ที่ได้จากข้าวโพด chloroplastic transient peptide ของ rubisco ที่ได้จาก *Brassica napus* และยีนต้านทานต่อสารไกลโฟเสทจากแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ไปจากปกติ (mutated *EPSPS* gene) ซึ่งใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนทั้งหมดนี้ถูกควบคุมการแสดงออกโดย CaMV 35S promoter และ *nos* terminator และได้มีการทดลองถ่าย vector ดังกล่าวเข้าสู่ยาสูบ แล้วเพาะเลี้ยงยาสูบบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสทเพื่อคัดเลือกยาสูบที่แสดงลักษณะต้านทาน ตรวจสอบผลการเข้าไปแทรกตัวในจีโนมพืชและการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งพบว่า vector ใหม่ที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าการนำยีนต้านทานสารปฏิชีวนะมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการทดลอง

ก้านใบอ่อนลำดับที่ 2 และ 3 ของสับดัมพันธุ์โคราช

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วย ชั้นวางเนื้อเยื่อพร้อมระบบไฟฟ้าให้ความสว่าง และเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ค้ามืดและใบมีดผ่าตัด ปากกิบ जानแก้ว และตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

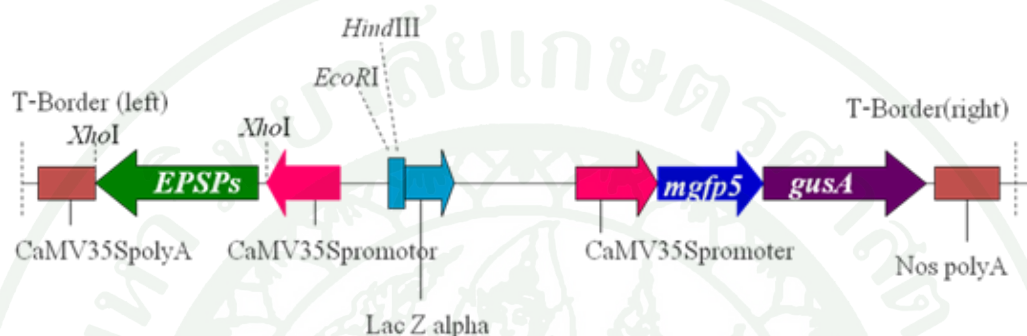
2.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS รวมทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละขั้นตอน

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.1 เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 สำหรับใช้ถ่ายยีนเข้าสู่พืช

A. tumefaciens สายพันธุ์ EHA105 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงมาก (hyper-virulence strain) ที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงและสามารถเข้าบุกรุกพืชได้หลายชนิด (broad host range) โดยเฉพาะพืชในวงศ์ Solanaceae *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พัฒนามาจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่บรรจุ Ti-plasmid คือ pEHA105 (Hood et al., 1993)

3.2 พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (ภาพที่ 2) ขนาด 12,935 คู่เบส ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็น backbone ประกอบด้วย CaMV-35S promoter และ CaMV-35S polyA ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *EPSPs* และ CaMV-35S promoter และ Nos poly-A ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *gusA* และ *mgfp5* (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุบิน หินจันทร์)



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (กุสุมา, 2554)

3.3 อุปกรณ์สำหรับการถ่ายยีนและตรวจวิเคราะห์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (low speed centrifuge) เครื่องผสมสาร (vortex®) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) เครื่อง PCR เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ (gel electrophoresis) และเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation) เป็นต้น

3.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนและตรวจวิเคราะห์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสูตร Luria Bertani (LB) สารปฏิชีวนะ cefotaxime (Claraxim® 10, Siam Bheasach Co., Ltd.) สารไกลโฟเสท (N-(Phosphonomethyl)-glycine, 96% บริษัท Sigma-Aldrich®) สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค PCR และการทำปฏิกิริยา Southern PCR hybridization เป็นต้น

3.5 ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนคัดเลือก *EPSPs* ด้วยเทคนิค PCR (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุบิน หินจันทร์)

EPSPs (forward): 5'-CCA TTC CGC TCG AGA TGG CAC AAA TTA ACA ACA TGG C-3'

EPSPs (reverse): 5'-ATC CAC CGC TCG AGC GGT CAT CAG GCA GCC TTC GTA T-3'

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสปีดทำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์

1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำก้านใบอ่อนลำดับที่ 2 หรือ 3 จากปลายยอดของสปีดพันธุ์โคราช มาล้างให้สะอาด จากนั้นแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อที่ฟิวด้วยสารละลายไฮเตอร์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 ประมาณ 1-2 หยด แช่เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตัดก้านใบอ่อนเป็นท่อนขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร และ thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 5.6-5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นานประมาณ 6-8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ (นุชจิรี, 2551)

1.2 การชักนำให้เกิดต้น

แยกแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร และ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 5.6-5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ (นุชจิรี, 2551)

2. การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและแคลลัสของสปีด

2.1 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มี พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ($OD_{600}=1$) จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลวสูตร MS เท่าปริมาตรเดิม ย้ายแคลัสสปู่ดำที่ถูกตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการ preculture บนอาหารสูตรชักนำแคลัสนาน 12 ชั่วโมง ลงแช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อ เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำแคลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ และมีสารปฏิชีวนะ cefotaxime (Claraxim[®] 10, Siam Bheasach Co., Ltd.) ความเข้มข้น 0 100 200 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียทุก 7 วัน จนครบ 14 วัน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้น

2.2 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลัสสปู่ดำ

นำแคลัสสปู่ดำขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ (สูตรชักนำแคลัส) และมีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 นาน 4 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลัสที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ จึงย้ายแคลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ (สูตรชักนำยอด) เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 นาน 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลจำนวนแคลัสและยอดที่สามารถเจริญเติบโตได้ วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้น

3. การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารไกลโฟเสตต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสสปูดำ

นำแคลลัสสปูดำขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตรชักนำแคลลัสที่มีสารละลายสารไกลโฟเสต (N-(Phosphonomethyl)-glycine, 96% บริษัท Sigma-Aldrich®) ความเข้มข้น 0 1 2 3 หรือ 4 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละ ทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชัน

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำ

เลี้ยงเชื้อเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน EPSPs เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานประมาณ 16 ชั่วโมง ($OD_{600}=1$) จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วแทนที่ด้วยอาหารเหลวสูตร MS เท่าปริมาตรเดิม กวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร MS ในสัดส่วนต่าง ๆ คือ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 หรือ 1:100 และเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครโมลาร์ นำแคลลัสขนาดชิ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการ preculture บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสนาน 12 ชั่วโมง แช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อ เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 30 นาที แล้วขับแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่นิ่งมาเชื้อแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงแคลลัสลงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส ที่มีสาร acetosyringone

100 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีคนาน 3 วัน จึงล้างเชื้อออกจากแคลลัส ด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้าย

แคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) หลังจากเริ่มถ่ายยีนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละ ทริทเมนต์มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชั่น บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ จำนวนขึ้นตีดสี น้ำเงิน และให้คะแนนพื้นที่ตีดสีน้ำเงินบนแคลลัส โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 10 ระดับคะแนน ซึ่งแต่ละช่วงคะแนนจะกำหนด ให้มีพื้นที่ตีดสีน้ำเงิน ช่วงละ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

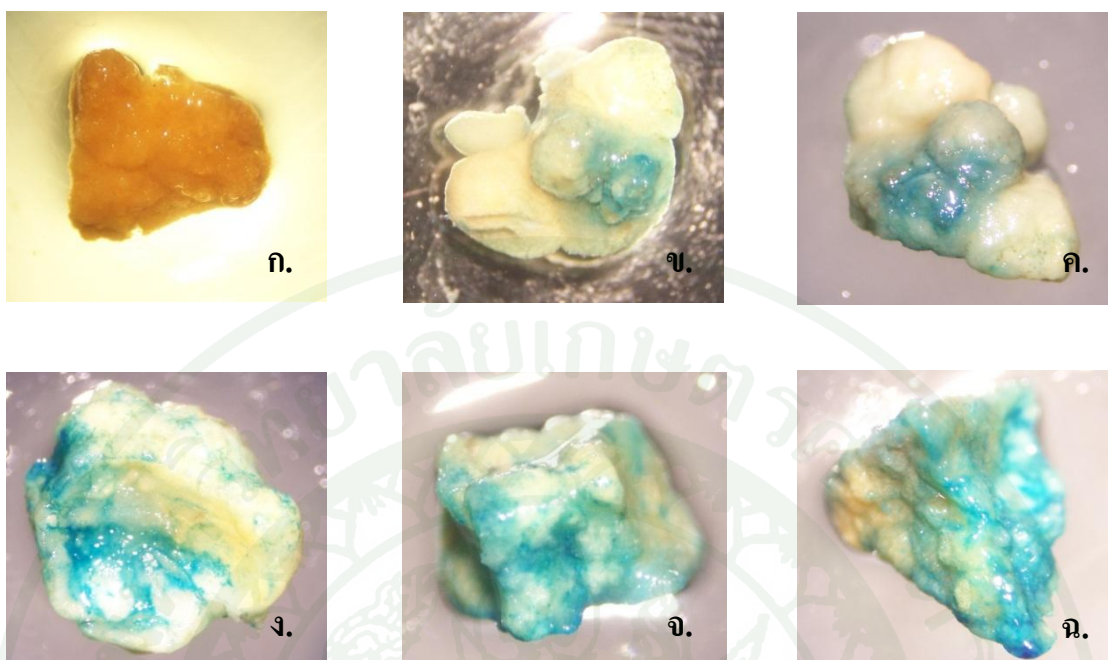
4.2 การศึกษาผลของระยะเวลาการปลูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพของการถ่าย ยีนเข้าสู่แคลลัสสุบุดำ

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 4.1 จากนั้นเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ โดยใช้สัดส่วน การเจือจางของเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่ออาหารเหลวสูตร MS ที่ 1:20 ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อที่มี ฝาปิด นำแคลลัสขนาดขึ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการ preculture บนอาหารสูตรชักนำ แคลลัสนาน 12 ชั่วโมง มาปลูกเชื้อโดยแช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ ปิดฝาแล้วนำไปเขย่าที่ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 10 20 30 หรือ 40 นาที แล้วจับแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วย กระดาษซับที่นิ่งมาเช็ดแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส ที่มีสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีคนาน 3 วัน จึงล้างเชื้อ ออกจากแคลลัสด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม ต่อลิตร แล้วย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) หลังจากเริ่มถ่ายยีนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละทริทเมนต์มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชั่น บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ จำนวนขึ้นตีดสีน้ำเงิน และให้คะแนนพื้นที่ตีดสีน้ำเงินบนแคลลัส โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 10 ระดับคะแนน โดยแต่ละช่วงคะแนนจะกำหนดให้มีพื้นที่ตีดสีน้ำเงิน ช่วงละ 10 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

4.3 การศึกษาผลของระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสนุ่นดำ

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 4.1 จากนั้นเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ โดยใช้สัดส่วนการเจือจางของเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่ออาหารเหลวสูตร MS ที่ 1:20 ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อและมีฝาปิด นำแคลลัสขนาดขึ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการ preculture บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสนาน 12 ชั่วโมง มาปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วจับแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่นิ่งมาเช็ดแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงแคลลัสลงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีดินนาน 1 2 3 และ 4 วัน จึงล้างเชื้อออกจากแคลลัสด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) หลังจากเริ่มถ่ายยีนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชั่น บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นดิสน้ำเงิน และให้คะแนนพื้นที่ดิสน้ำเงินบนแคลลัส โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 10 ระดับคะแนน โดยแต่ละช่วงคะแนนจะกำหนดให้มีพื้นที่ดิสน้ำเงิน ช่วงละ 10 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 3 เกณฑ์การให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบ
ชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay

- 0 คะแนน ไม่เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ (ก.)
- 1 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ข.)
- 2 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์
- 3 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (ค.)
- 4 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์
- 5 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ง.)
- 6 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์
- 7 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (จ.)
- 8 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์
- 9 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (ฉ.)
- 10 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

5. การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่แคลลัสต้นตำพันธุ์โคราช

หลังจากได้ทำการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ตามข้อ 4 แล้ว จึงได้นำผลการทดสอบที่ดีที่สุดมาใช้ในการถ่ายยีนซึ่งมีวิธีการดังนี้

5.1 การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($OD_{600}=1$) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วแทนที่ด้วยอาหารเหลวสูตร MS เท่าปริมาตรเดิม กวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหารเหลวสูตร MS ในอัตราส่วน 1:20 โดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 19 มิลลิลิตร กวนตะกอนให้แขวนลอย แล้วเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครโมลาร์

5.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ต้นตำพันธุ์โคราชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus ตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร preculture บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสนาน 12 ชั่วโมง แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:20 ร่วมกับสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ปิดฝาขวดด้วยเครื่องเขย่านาน 30 นาที ให้ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับเชื้ออย่างทั่วถึง แล้วซับแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นแคลลัสด้วยกระดาษซับที่นิ่งมาเชื้อแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีดินนาน 2 วัน ล้างเชื้อออกจากแคลลัสด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น

200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่านาน 30 นาที จึงย้ายเซลล์ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ คัดเลือกแคลลัสที่รอดชีวิตไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำยอดเพื่อชักนำให้พืชพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป

6. การตรวจวิเคราะห์สปีด้าที่ได้รับการถ่ายยีน

คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนและมีชีวิตรอด ภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกลานาน 4 สัปดาห์ มาวิเคราะห์การมีอยู่ของยีนในขั้นต้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ Southern PCR hybridization ตามวิธีการดังนี้

6.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

6.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสสปีด้า

สกัดจีโนมดีเอ็นเอจากแคลลัสสปีด้าที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนและต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) บดแคลลัสให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ในโตรเจนเหลว ตักแคลลัสที่บดจนละเอียดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย extraction buffer (2 % CTAB, 2 % PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 % (v/v) α -mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด เซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสารผสม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex นาน 5 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นาน 5 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ เติมนเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้าง ตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่มีเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบความเข้มข้น ของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA maker) บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที ใน 1X TBE buffer เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ต่อไป

6.1.2 การตรวจวิเคราะห์แคลัสสบูดำที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *EPSPs* โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 1 mM dNTP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์แต่ละชนิด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร dH_2O ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลัสสบูดำ 2 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation รอบแรกที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ จำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ สำหรับ denaturation, annealing และ extension เป็น 94 56 และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 นาที และ 90 วินาที ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิสำหรับ extension รอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแส ไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

6.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในแคลัสสบูดำที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดย เทคนิค Southern PCR hybridization

6.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สำหรับทำปฏิกิริยา hybridization ด้วยเทคนิค PCR Labeling

ใช้พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้พลาสมิดความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน *EPSPs* และติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบด้วย PCR DIG Labeling kit (บริษัท Roche Applied Science) ใช้อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบยีน ในข้อที่ 6.1.2

6.2.2 การเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในจีโนมของแคลลัสสปู่ดำ โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

หลังจากการตรวจสอบผลการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจดูแผ่นเจลด้วย UV-transilluminator แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N⁺ บริษัท Amersham Biosciences) ซึ่งมีขั้นตอนคือ ล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย depurination (0.25 M HCl) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH และ 1.5 M NaCl) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCl; pH 7.5 และ 1.5 M NaCl) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกรอบ ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาบนไนลอนเมมเบรนโดยวางกระดาษ Whatman 3 MM ใช้เป็นสะพานในอ่างที่มีสารละลาย 10X SSC (0.3 M sodium citrate และ 3 M NaCl) นำเจลที่ได้จากขั้นตอนด้านบนมาแช่ในสารละลาย 10X SSC ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลวางคว่ำหน้าลงบนกระดาษ Whatman 3 MM จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล วางทับด้วยกระดาษ 3MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลาย ๆ ชั้นให้มีความหนา 20 เซนติเมตร จากนั้นวางวัตถุที่มีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม ทับบนกระดาษซับอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 18 ชั่วโมงเพื่อให้แถบดีเอ็นเอ

เคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลขึ้นมาติดอยู่บนไนลอนเมมเบรน จากนั้นลอกไนลอนเมมเบรนออกจากเจล แล้วนำมาแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 3 นาที ฟlingไนลอนเมมเบรนให้แห้ง แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอนเมมเบรนและนำไปทำ ปฏิกริยา hybridization ต่อไป

6.2.3 การทำปฏิกริยา hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 6.2.2 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (5X SSC, 0.1 % N-lauroylsarcosine, 0.02 % SDS และ 1X blocking solution) โดยเติมสารละลาย hybridization ลงในหลอด hybridization ที่ใส่ไนลอนเมมเบรน ใช้ปริมาตร สารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ไนลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากข้อ 6.2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดดังกล่าว แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปเติมลงในหลอด hybridization ที่มีไนลอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

6.2.4 การตรวจสอบผลการ hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization จากข้อ 6.2.3 มาล้างด้วย สารละลาย low stringency buffer (2x SSC, 0.1 % SDS) โดยเติมสารละลายให้ท่วมไนลอน เมมเบรน เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย สารละลาย high stringency buffer (0.1x SSC, 0.1 % SDS) โดยเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (1x maleic acid buffer, 0.3 % Tween 20) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 1x blocking solution ที่ได้จากการเจือจาง 10x blocking solution ด้วย maleic acid buffer ในอัตราส่วน 1 : 10 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำ ไนลอนเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugate alkaline phosphate ที่เจือจาง 1 : 10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้าง

ในลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วปรับสภาพในลอนเมมเบรนด้วยการแช่ในสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl (ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.5 ด้วย NaOH)) นาน 3 นาที โดยไม่ต้องเขย่า ย้ายในลอนเมมเบรนมาวางบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย chemiluminescent substrate (CDP starTM) เข้ากับ detection buffer ในอัตราส่วน 1 : 500 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเคลี่ยลงบนในลอนเมมเบรนให้ทั่ว วางในลอนเมมเบรนไว้ในที่มืด นาน 1 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง นำในลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์มโดยทำในห้องมืด นาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดจึงล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนฟิล์ม

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

8. ระยะเวลาทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่าง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2555

ผลและวิจารณ์

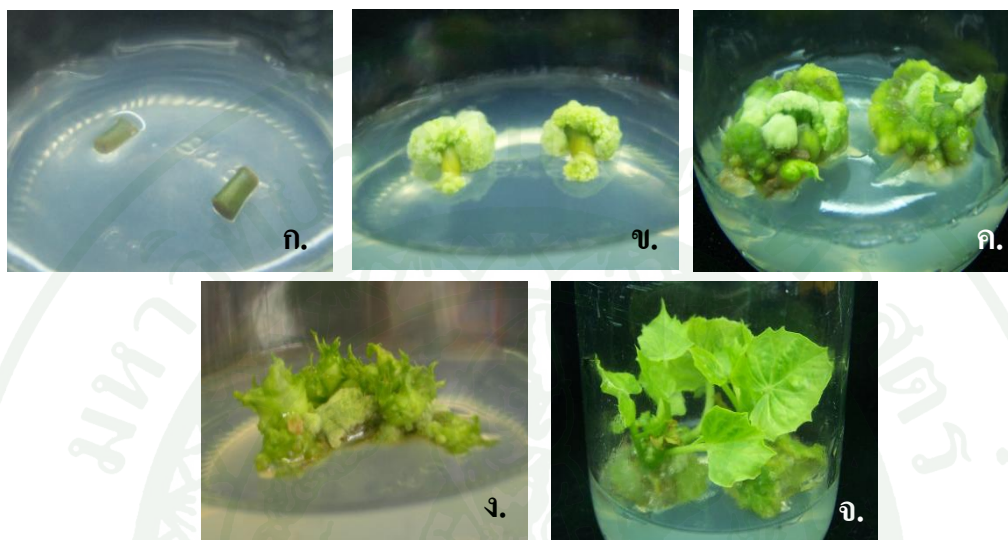
1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบูดำเพื่อให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์

จากการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนของสบูดำบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มี thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตและขยายขนาด โดยมีแคลลัสสีเขียวอ่อนเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดทั้งสองด้าน โดยแคลลัสที่เกิดจากบริเวณรอยตัดด้านโคนก้านใบมีการเจริญเติบโตและขยายขนาดได้รวดเร็วกว่าบริเวณรอยตัดด้านปลายก้านใบ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 6-8 สัปดาห์ แคลลัสมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีทั้งสีเขียวอ่อนและสีเขียวเข้ม ลักษณะผิวขรุขระ และเกาะกันแน่นเป็นแคลลัสชนิด compact callus และมีบางส่วนที่นุ่มน้ำ อ่อนนุ่มมีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งเป็นแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ นอกจากเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นแคลลัสแล้ว ยังพบว่าการเกิดยอดอ่อนขึ้นอีกด้วย แต่ยอดที่ได้มีขนาดเล็กและไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่าในระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อมีการปลดปล่อยสารในกลุ่ม phenolic compound ออกมา ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงบริเวณ รอบ ๆ เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเอนไซม์ phenol oxidase หรือ tyrosinase ทำปฏิกิริยากับอากาศหรือสารในกลุ่ม auxin หรือ cytokinin ทำให้เกิดสารสีน้ำตาลและไปขัดขวางการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช (อารีย์, 2541)

ทั้งนี้ Fellman *et al.* (1987) รายงานว่า TDZ เป็นสารประกอบประเภท phenyl urea สามารถช่วยกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ และ Junyan *et al.* (1994) รายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัส ทำลายการพักตัวของตา และส่งเสริมการเกิด organogenesis ของ *Cayratia japonica* นอกจากนี้ยังมีรายงานการกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญในพืชชนิดอื่น ได้แก่ *Malus domestica* (Van Nieuwkerk *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986) *Carica pentagona* (Zhou and Collet, 1989), และ *Rubus* sp. (Fiola *et al.*, 1990) เป็นต้น

เมื่อย้ายแคลลัสชนิด compact callus ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แต่ยอดที่ได้มีลักษณะสั้น (ภาพที่ 4) ทั้งนี้ Shah *et al.* (2010) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงยอดของสบูดำบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 6-benzyl amino purine (BAP) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ

gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดยืดยาวได้ดี ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหายอดที่มีลักษณะสั้นของสับดูดำได้



ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับดูดำพันธุ์โคราชในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตร ต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

- ก. ก้านใบอ่อนหลังจากถูกตัดให้เป็นท่อนยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร
- ข. ลักษณะแคลลัสสับดูดำหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์
- ค. ลักษณะแคลลัสสับดูดำหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ นาน 8 สัปดาห์
- ง. ลักษณะยอดอ่อนหลังจากการนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์
- จ. ต้นสับดูดำหลังจากการตัดยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ นาน 8 สัปดาห์

2. การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียและการเจริญเติบโตของแคลลัสสุ่มดำ

โดยปกติภายหลังจากการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียจำเป็นต้องมีการกำจัดเชื้อออกจากชิ้นเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ คือสารปฏิชีวนะ cefotaxime แต่การเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นอาจส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้ ดังนั้น จึงได้มีศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุด

สารปฏิชีวนะ cefotaxime เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins ซึ่งเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย 4-membered β -lactam ring เช่นเดียวกับกลุ่ม penicillins ใช้รักษาโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้อย่างกว้างขวาง มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยออกฤทธิ์เป็น bactericidal ต่อเชื้อแบคทีเรีย เหมือนยาในกลุ่ม penicillins มีโครงสร้างคล้าย alanine residue ซึ่งแย่งจับกับเอนไซม์ transpeptidase แทน alanine residue ของ peptidoglycan สายแรก ทำให้ยับยั้งการเกิด cross link กับ peptidoglycan สายที่สอง ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้เชื้อมีผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ โดยเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยยาในกลุ่ม penicillins และ cephalosporins นี้อาจเรียกรวม ๆ ว่า penicillin-binding proteins (PBPs) (ปรีชา และสุทธิพร, 2549)

2.1 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ผ่านการปลูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้แคลลัสจำนวนชิ้นละ 5 ชิ้นในแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime มีเชื้อเจริญขึ้นอยู่รอบ ๆ และปกคลุมบนชิ้นเนื้อเยื่อทุกชิ้นภายในสัปดาห์แรก ส่วนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงได้นาน 1 สัปดาห์ พบเชื้อเริ่มเจริญขึ้นอยู่บริเวณรอบ ๆ ชิ้นเนื้อเยื่อบางชิ้น และเจริญจนปกคลุมชิ้นเนื้อเยื่อทั้งชิ้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 6) โดยมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นเนื้อเยื่อที่

ติดเชื้อ 33.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) ส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียแบบที่เรียบ แสดงว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นตั้งแต่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนอาหาร นอกจากแคลสสปูค้ำภายหลังการถ่ายยีนได้ ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปทำนองเดียวกับการทดลองของ สุวีรัตน์ (2553) ที่พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 และเอ็มบริโอเจนิคแคลสของปาล์มน้ำมันสามารถพัฒนาและสร้างโชมอดิกเอ็มบริโอได้

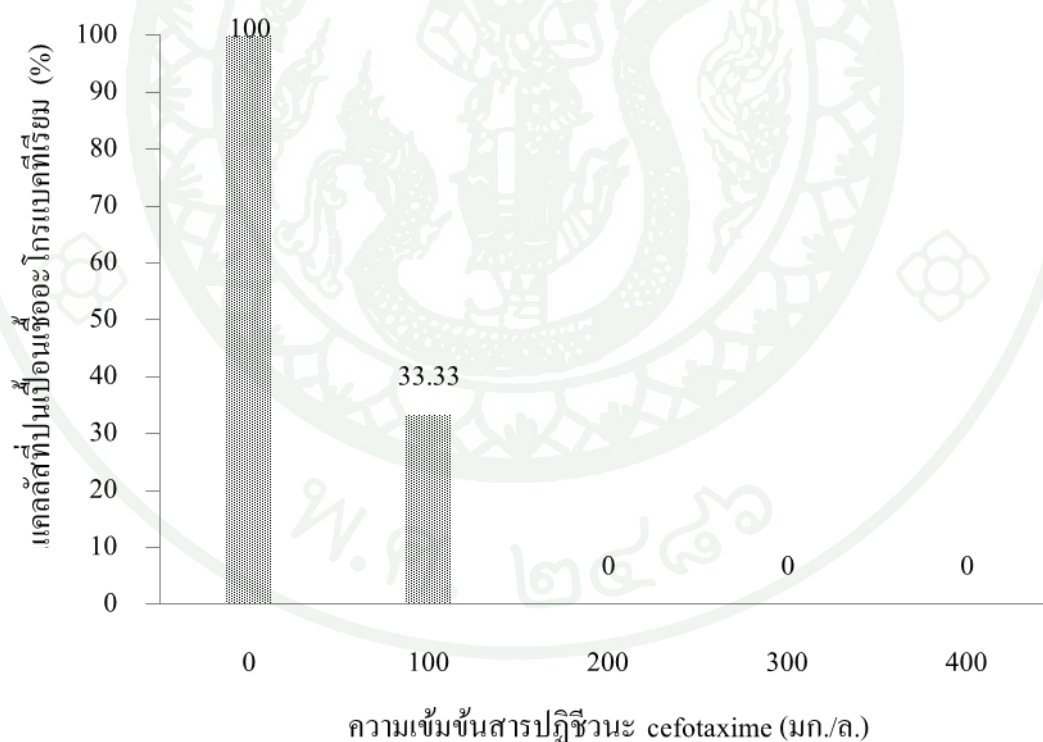
2.2 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลสสปูค้ำ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลสสปูค้ำขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตรชักนำแคลสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้แคลสจำนวนซ้ำละ 5 ชิ้นในแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของแคลสหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า แคลสสปูค้ำทุกชิ้นสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติบนอาหารสูตรชักนำแคลสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในทุกระดับความเข้มข้น (ภาพที่ 7) เมื่อย้ายแคลสมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำแคลสที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 4 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำยอดนาน 6 สัปดาห์ พบว่า แคลสสปูค้ำที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในทุกระดับความเข้มข้นสามารถเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ (ภาพที่ 8) โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับการทดลองของ Li *et al.* (2007) ที่รายงานไว้ว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลยับยั้งการเกิดแคลสและยอดจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงของสปูค้ำ ซึ่งผลทำนองเดียวกันนี้พบได้ในพืชอื่น เช่น สุวีรัตน์ (2553) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลสของปาล์มน้ำมันบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลสสามารถพัฒนาไปเป็นโชมอดิกเอ็มบริโอได้ แต่เปอร์เซ็นต์การสร้างโชมอดิกเอ็มบริโอและจำนวนโชมอดิกเอ็มบริโอลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะความเข้มข้นสูงขึ้น

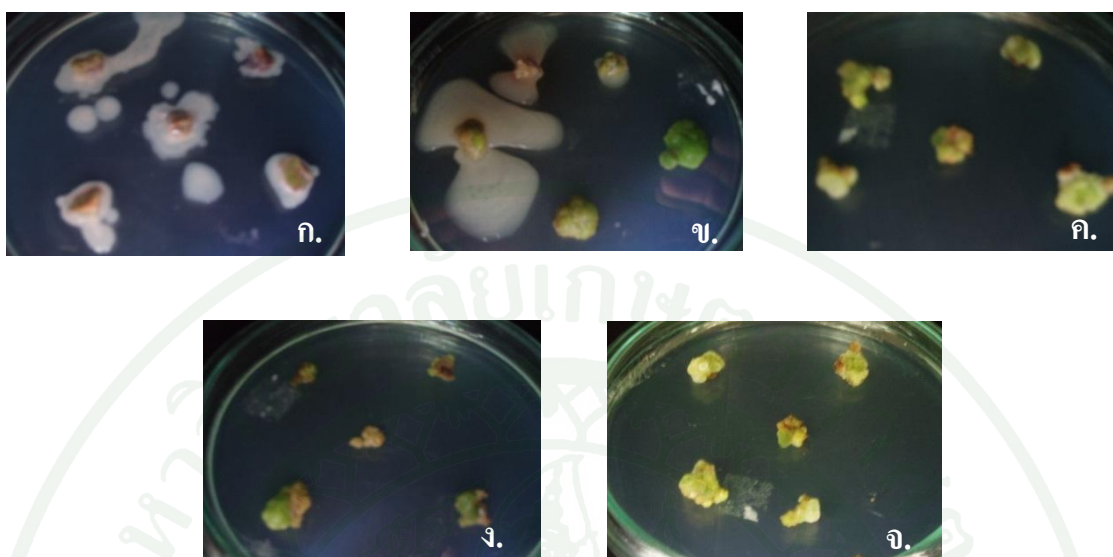
กัญญา และคณะ (2549) เพาะเลี้ยงแคลสของถั่วฮามาต้าบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 100-600 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของ cefotaxime ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลทำให้แคลสตาย และมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนายอดโดยเฉลี่ย

ของแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ และ Mittal *et al.* (2009) พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากจะช่วยเพิ่มจำนวนโชมaticเอ็มบริโอของอ้อยแล้วยังเพิ่มความสามารถในการเกิดยอดอีกด้วย แต่ถ้าว้ใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับส่งผลให้จำนวนของโชมaticเอ็มบริโอและความสามารถในการเกิดยอดลดลง

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นตั้งแต่ 60-100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถช่วยส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี (Mathias and Boyd, 1986) ข้าวบาร์เลย์ (Mathias and Mukasa, 1987) และข้าวฟ่างไข่มุก (Pius *et al.*, 1993) เป็นต้น แต่ในพืชบางชนิดมีรายงานว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีผลยับยั้งการเกิดแคลลัส เช่น ในแครอท (Okkels and Pedersen, 1988)

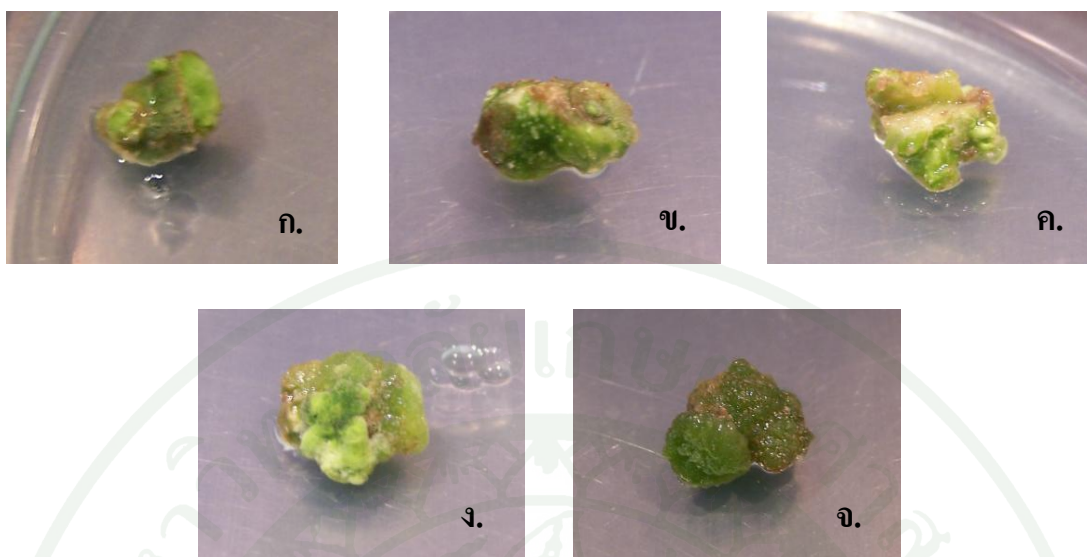


ภาพที่ 5 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ภายหลังการปลูกเชื้อลงบนแคลลัสสนุ่นดำ และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 2 สัปดาห์



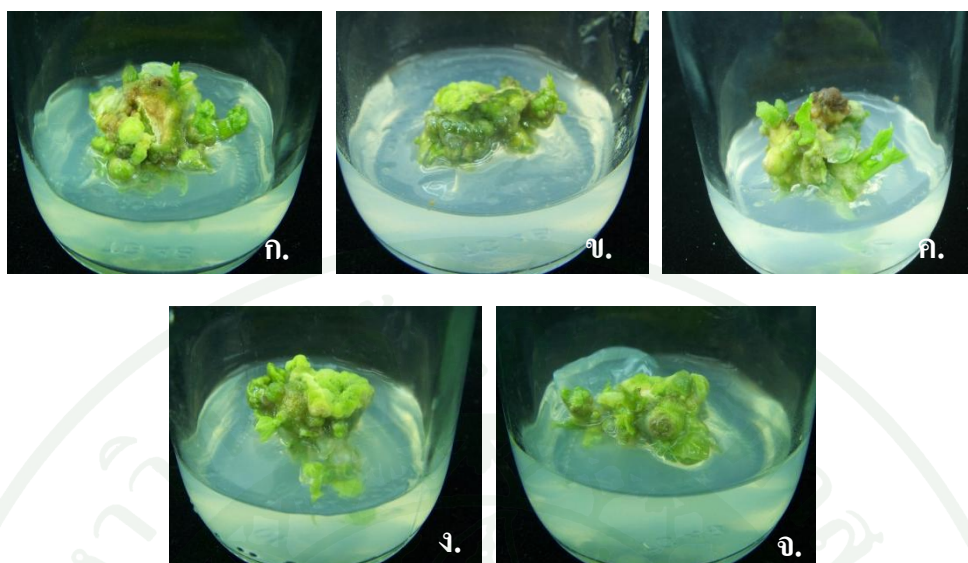
ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 หลังจากปลูกเชื้อลงบนแคลลัสสนุ่มดำ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของแคลลัสต้นผู้โคราช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 8 การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสกล้วยน้ำว้าพันธุ์โคราซที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำ แคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์ แล้ว เพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด นาน 6 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ยของสปูดำพันธุ์โคราชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำ แคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดนาน 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime (มก./ล.)	จำนวนชิ้นที่เกิดยอด (%)	จำนวนยอดต่อชิ้น
0	100	3.47
100	100	3.20
200	100	3.27
300	100	3.40
400	100	3.33
F-test	-	ns
CV(%)	-	41.51

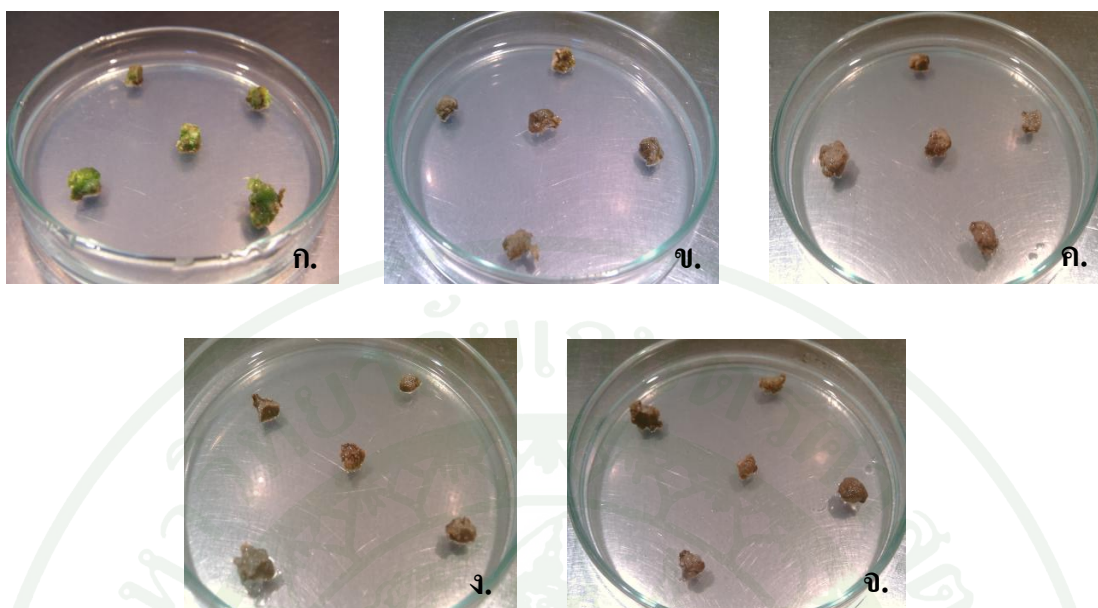
ns: nonsignificant

3. การศึกษาผลของสารไกลโฟเสตต่อการเจริญเติบโตของแคลัสสับุดำ

เนื่องจากพลาสติกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี *EPSPs* ซึ่งเป็นอินที่สามารช่วยให้อพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสต ดังนั้นจึงได้ใช้ยีนนี้เป็นยีนคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่แสดงออกในการต้านทานต่อสารไกลโฟเสต ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์

5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPs) โดยเป็นเอนไซม์สำคัญใน shikimate pathway ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน สารประกอบอื่น ๆ รวมทั้งวิตามิน สารตั้งต้นต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (Öz *et al.*, 2009) เมื่อพืชไม่สามารถสังเคราะห์สารเหล่านี้ได้จึงทำให้เกิดการตายของเซลล์พืชในที่สุด อย่างไรก็ตาม การที่จะนำสารคัดเลือก เช่น สารปฏิชีวนะ หรือสารกำจัดวัชพืชมาใช้สำหรับคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนจำเป็นที่จะต้องทราบถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถทำให้อเนื้อเยื่อพืชปกติตาย

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลัสสับุดำขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร บนอาหารสูตรชักนำแคลัสที่มีสารไกลโฟเสตความเข้มข้น 0 1 2 3 หรือ 4 มิลลิโมลาร์ โดยใช้แคลัสจำนวนซ้ำละ 5 ชิ้นในแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของแคลัสหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่มีสารไกลโฟเสตความเข้มข้น 3 และ 4 มิลลิโมลาร์ ทำให้อแคลัสทุกชิ้นหยุดชะงักการเจริญเติบโตแล้วเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารไกลโฟเสตความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ แคลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างช้า ๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และตายทุกชิ้นภายในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนแคลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารไกลโฟเสตสามารถเจริญเติบโตได้ปกติ (ภาพที่ 9) ดังนั้นการใช้สารไกลโฟเสตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้อแคลัสตายทั้งหมด จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการคัดเลือกแคลัสสับุดำที่มีการแสดงออกของลักษณะต้านทานต่อสารไกลโฟเสตภายหลังจากการถ่ายยีนได้



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตของแคลลัสสำริดพันธุ์โคราช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารไกลโฟเสตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสต 0 มิลลิโมลาร์
- ข. ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสต 1 มิลลิโมลาร์
- ค. ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสต 2 มิลลิโมลาร์
- ง. ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสต 3 มิลลิโมลาร์
- จ. ความเข้มข้นของสารไกลโฟเสต 4 มิลลิโมลาร์

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สับดูคำโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สับดูคำพันธุ์โคราชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ซึ่งบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและยีน EPSPs เป็นยีนคัดเลือก วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชั้น โดยทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ระยะเวลาการปลูกเชื้อ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวหลังจากการถ่ายยีน 1 สัปดาห์ โดยวิธี GUS histochemical assay เมื่อพิจารณาจากจำนวนชิ้นเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า ในทุกชุดการทดลองเซลล์ติดสีน้ำเงินทุกชั้น เมื่อพิจารณาผลของระดับการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วนต่าง ๆ ต่อระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นเซลล์ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้การที่เพิ่มความเข้มข้นของเชื้อให้สูงขึ้นในช่วง 1:100-1:20 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของเชื้อมากขึ้นตั้งแต่ 1:10 จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง ทั้งนี้ระดับการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:20 ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุดเท่ากับ 6 คะแนน (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดลองปลูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 เข้าสู่ใบอ่อนสับดูคำของ Zong *et al.* (2010) ที่พบว่า การใช้เชื้อที่ความเข้มข้นสูงๆ มีผลทำให้ pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน และในพืชชนิดอื่นก็มีรายงานไว้ว่าการใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนลดลงด้วยเช่นกัน เช่นใน *Melastomataceae* spp. (Yong *et al.*, 2006) และใน *Juncus effuses* L. (Xu *et al.*, 2009) แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้เชื้อที่ความเข้มข้นต่ำมากเกินไปก็จะทำให้ความถี่ของการส่งผ่าน T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจึงลดลง (Mannan *et al.*, 2009)

สำหรับผลของระยะเวลาการปลูกเชื้อต่อระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นเซลล์ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการปลูกเชื้อนาน 30 และ 40 นาที ให้ผลดีที่สุด และไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุดเท่ากับ 4.27 คะแนน ส่วนการปลูกเชื้อ 20 และ 10 นาที ที่ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยลดลงเป็น 2.73 และ 1.73 คะแนน ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้การใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อน้อยหรือนานเกินไปต่างส่งผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนทั้งสิ้น Mannan *et al.* (2009) อธิบายว่าการใช้ระยะเวลาปลูกเชื้อน้อยจะส่งผลให้จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนน้อยลงไปด้วย แต่เมื่อใช้ระยะเวลาปลูกเชื้อนาน

เกินไปทำให้เนื้อเยื่อพืชแช่อยู่ในอาหารเหลวเป็นเวลานานจนอาจอยู่ในสภาวะ hypertonic ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการแตกของเซลล์พืชได้ หรืออาจทำให้เกิดการกระตุ้นของกลไกการป้องกันตัวของเซลล์พืชที่มากเกินไปจนทำให้เซลล์ตาย และส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง

เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อต่อระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัสพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยเช่นกัน โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุดเท่ากับ 4.33 คะแนน รองลงมาคือการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 1 วัน และ 3-4 วัน (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดลองนี้ให้ผลในทำนองเดียวกันกับการทดลองของ Zong *et al.* (2010) ที่พบว่าการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 5 วัน เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงที่สุด ในขณะที่การเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 6-7 วัน ส่งผลให้ชิ้นส่วนใบอ่อนตาย และเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อในระยะเวลาสั้นเพียง 2-3 วัน พบว่าให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวน้อยกว่าการเลี้ยงร่วมนาน 5 วัน ซึ่งสรุปแนวโน้มในทำนองเดียวกันคือ ระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่สั้นเกินไป หรือนานเกินไปส่งผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน แต่อย่างไรก็ตามจำนวนวันที่เหมาะสมที่แตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกัน อาจเนื่องมาจากการใช้สายพันธุ์พืชที่ต่างกัน หรือการใช้เนื้อเยื่อพืชที่ต่างกัน ซึ่ง Mannan and Mirza (2009) อธิบายว่า เซลล์พืชมีความต้องการช่วงเวลาสำหรับการนำชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามารวมตัวกับจีโนมต่างกัน ดังนั้นระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อจึงมีความสำคัญ และส่งผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีน โดยระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่สั้นเกินไปจะลดโอกาสการเข้าไปเชื่อมต่อกับจีโนมพืชของดีเอ็นเอเป้าหมาย ขณะที่การใช้ระยะเวลานานเกินไปส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ เนื่องจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณได้มากเกินไปจนแย่งสารอาหารจากเนื้อเยื่อพืช อย่างไรก็ตามการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2-3 วัน เป็นระยะเวลาที่นิยมใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด เช่นใน กล้วยไม้สกุลหวาย (Men *et al.*, 2003) ทานตะวัน (Weber *et al.*, 2003) และ *Melastomataceae* spp. (Yong *et al.*, 2006)

จากการทดลองนี้พบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของस्पुदाพันธุ์โคราช คือ การใช้ระดับการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:20 การปลูกเชื้อนาน 30 นาที และการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสี และระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้น
แคลลัส ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression)
โดยวิธี GUS histochemical assay ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่
แคลลัสสับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs
1304 โดยใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน ที่ระดับการ
เจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วนต่าง ๆ

ระดับการเจือจางเซลล์ แขวนลอยเชื้อ	จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อติดสี (%)	คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน ^{1/}
1:0	100	2.47 d
1:1	100	4.4 bc
1:10	100	5.2 ab
1:20	100	6.0 a
1:50	100	3.53 cd
1:100	100	2.87 d
F-test	-	**
CV(%)	-	23.44

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี
DMRT

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสี และระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำตาลบนชิ้น
แคลลัส ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression)
โดยวิธี GUS histochemical assay ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่
แคลลัสสับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs
1304 โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1:20 และเลี้ยงร่วมกับเชื่อนาน
3 วัน ที่ระยะเวลาการปลูกเชื้อต่าง ๆ

ระยะเวลาการปลูกเชื้อ (นาท)	จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อติดสี (%)	คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำตาล ^{1/}
10	100	1.73 b
20	100	2.73 b
30	100	4.27 a
40	100	4.27 a
F-test	-	**
CV(%)	-	23.12

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี
DMRT

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสี และระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้น
แคลลัส ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression)
โดยวิธี GUS histochemical assay ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่
แคลลัสสับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs
1304 โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1:20 และใช้ระยะเวลาการปลูก
เชื้อ 30 นาที ที่ระยะเวลาดูแลร่วมกับเชื้อต่าง ๆ

ระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (วัน)	จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อติดสี (%)	คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน ^{1/}
1	100	2.53 b
2	100	4.33 a
3	100	1.06 c
4	100	1.13 c
F-test	-	**
CV(%)	-	23.05

** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี
DMRT

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

5. การถ่ายยีน EPSPs เข้าสู่แคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

จากการถ่ายยีน EPSPs เข้าสู่แคลลัสสปุ่มดำที่ผ่านการ preculture บนอาหารสูตรชักนำ แคลลัสนาน 12 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ อะโกรแบคทีเรียที่บรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นพาหะ และใช้ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดตามข้อ 4. คือ ใช้สัดส่วนการเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อที่ 1:20 ปลุกเชื่อนาน 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื่อนาน 2 วัน ภายหลังจากการถ่ายยีน 1 สัปดาห์ นำแคลลัส มาคัดเลือกบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 4 สัปดาห์ มีแคลลัสที่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกจำนวน 15 ชิ้น จากแคลลัสที่ถ่ายยีนทั้งหมด 500 ชิ้น ซึ่งคิดเป็นประสิทธิภาพการถ่ายยีนเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วน แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไป (ภาพที่ 10)

เมื่อนำแคลลัสสปุ่มดำที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกมาชักนำให้เกิดเป็นต้นบนอาหารแข็ง สูตรชักนำยอดที่ปราศจากสารไกลโฟเสทนาน 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสจำนวน 6 ชิ้นเริ่มเปลี่ยนเป็น สีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนแคลลัสอีก 9 ชิ้นที่มีชีวิตยังคงมีสีเขียวปกติ แต่มีการเจริญเติบโตและ ขยายขนาดช้า รวมทั้งไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น อายุของเนื้อเยื่อพืชที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลานาน และสารคัดเลือกที่ใช้อาจมี ผลทำให้ประสิทธิภาพการเกิดยอดจากแคลลัสลดลง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นระยะเวลานาน มีรายงานว่าส่งผลต่อความสามารถในการ ชักนำให้เป็นต้นภายหลังจากการถ่ายยีนลดลง (Wang *et al.*, 2005) ซึ่งอาจเนื่องมาจากระบบการ ชักนำให้เกิดต้นภายหลังจากการถ่ายยีนอาจยังไม่เหมาะสม ซึ่ง สุมนา (2550) ทดลองชักนำให้เกิด ต้นของหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) ซึ่งพบว่า ก่อนการถ่ายยีนสามารถชักนำให้เกิดต้นจาก แคลลัสได้ แต่ภายหลังจากการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่า ไม่สามารถชักนำ ให้แคลลัสของหญ้ารูซี่ที่รอดชีวิตพัฒนาเป็นต้นได้ โดยแนะนำว่าควรมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการ ชักนำให้เกิดต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การพัฒนาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ใน การชักนำต้น หรือการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม ซึ่งเมื่อถ่ายยีนแล้วจะสามารถชักนำให้เกิดต้น ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองของ Vogel *et al.* (2006) ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหญ้า *Brachypodium distachyon* จำนวน 10 สาย พันธุ์ แต่พบว่า ภายหลังจากการถ่ายยีนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนจากแคลลัสต่ำ โดยเปอร์เซ็นต์การ

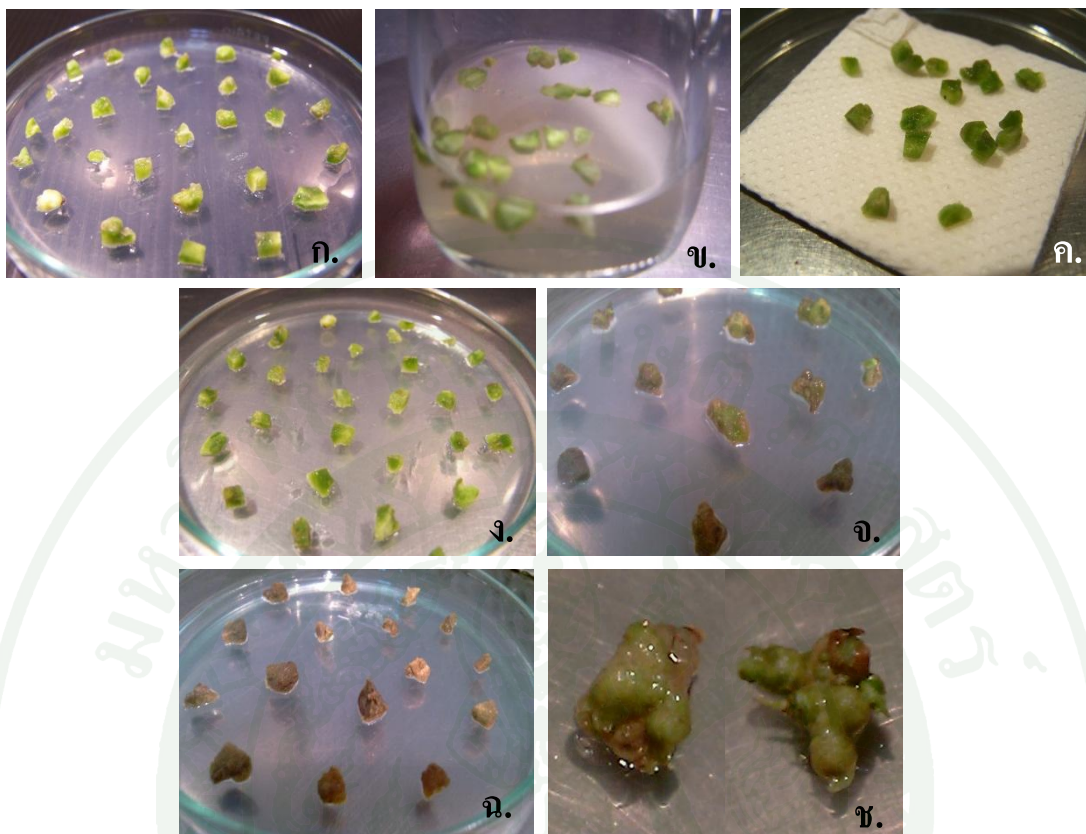
เกิดต้นลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลง โดยมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเท่ากับ 0.4-15 เปอร์เซ็นต์

นอกจากปัจจัยที่กล่าวแล้วยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับสารปฏิชีวนะและสารคัดเลือกที่อาจส่งผลเสียต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสติก เช่น มีรายงานว่า สารปฏิชีวนะที่ใช้ระหว่างเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีนมีผลต่อการพัฒนาและเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเช่นกัน (Lin *et al.*, 1995; Nauerby *et al.*, 1997) โดยมีรายงานการใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนติดต่อกันเป็นเวลานานอาจส่งผลต่อความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นของพืชได้ เช่น Hammerschlag *et al.* (1997) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแอปเปิ้ลบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ สำหรับใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน รวมทั้งสารปฏิชีวนะ cefotaxime พบว่าการใช้สารปฏิชีวนะความเข้มข้นต่ำแต่เป็นระยะเวลานานจะมีผลยับยั้งการพัฒนาและเกิดยอดของแอปเปิ้ล โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 52 วัน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของแอปเปิ้ลลดลงเหลือเพียง 47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของแอปเปิ้ลเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสตูปุ่มในช่วงแรกของงานวิจัยนี้ตามข้อที่ 2.2 นั้นเป็นการศึกษาเพียงระยะเวลาสั้นเพียง 4 สัปดาห์ จึงไม่อาจทราบผลระยะยาวของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการชักนำให้เกิดต้นของสับดูดาเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนานได้

นอกจากนี้การใช้สารไกลโฟเสทเพื่อคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนก็มีรายงานว่าส่งผลต่อความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นของพืชภายหลังการถ่ายยีนได้เช่นกัน โดย Hu *et al.* (2003) รายงานว่า สารไกลโฟเสทมีผลไปยับยั้งกระบวนการพัฒนาและยืดยาวของเนื้อเยื่อเจริญในระหว่างคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีนของข้าวสาลี ส่วน Öz *et al.* (2009) รายงานว่า การใช้สารไกลโฟเสทความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้การเกิดยอดของถั่ว chickpea ลดลงเนื่องจากการใช้สารไกลโฟเสทความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปจะทำให้พืชอยู่ในสภาวะเครียดและมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อน้อย ซึ่งพบว่าการเกิดตายอดในระยะแรก แต่ตายอดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ เช่นเดียวกับ Tong *et al.* (2010) พบว่า ปัญหาที่พบบ่อยภายหลังการถ่ายยีนคือ เมื่อมีการใช้สารไกลโฟเสทความเข้มข้นสูงระหว่างการคัดเลือกส่งผลให้มีอัตราการเกิดต้นที่ต่ำลงไปด้วย และยากที่จะชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านกระบวนการ somatic embryogenesis

ผลการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่สบูดำในครั้งนี้นี้สอดคล้องกับหลายการทดลองที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นภายหลังจากการถ่ายยีนได้หรือมีความสามารถในการเกิดต้นต่ำ เช่น Zhao *et al.* (2006) ถ่ายยีน *aroA-M1* เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก เข้าสู่ฝ้ายสายพันธุ์ Zhongmian 35 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก hypocotyl ที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวนเพียง 40 ยอด จากเนื้อเยื่อนำมาถ่ายยีนทั้งหมด 1,790 ชิ้น และ Roudsari *et al.* (2009) รายงานว่า หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่ plastid ของยาสูบโดยใช้พลาสมิด pKCZ ที่มียีน *EPSPs* ด้วยวิธียิงอนุภาค พบว่า ไม่สามารถชักนำให้ยาสูบเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสททุกความเข้มข้นที่ทดสอบ เนื่องจากสารไกลโฟเสทมีผลทำให้ plastid เสียหายไปก่อนที่จะแสดงลักษณะต้านทาน โดยเมื่อนำ plastid ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโครงสร้างของไทลาคอยด์และเยื่อหุ้มเกิดความเสียหาย

นอกจากนี้สาเหตุที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นภายหลังจากการถ่ายยีนได้อาจเนื่องมาจากสภาพที่ไม่เหมาะสมของระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Arash *et al.* (2010) รายงานว่า เนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้อมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างจากเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ โดยจากการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ลำปลิวด้วยอะโกรแบคทีเรีย พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด และ hypocotyl ที่ผ่านการถ่ายยีนบนอาหารที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดต่อชิ้น และเปอร์เซ็นต์ยอดที่ได้รับการถ่ายยีนสูงที่สุด ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายยีนต้องการ BAP ความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ดังนั้นระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมภายหลังจากการถ่ายยีนจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการชักนำให้พืชเกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้



ภาพที่ 10 ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสับุดำโดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

- ก. ลักษณะของแคลลัสที่ถูกตัดให้เป็นชิ้นสำหรับนำมาใช้ในการถ่ายยีน
- ข. ขั้นตอนการปลูกเชื้อ (inoculation) ในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสับุดำด้วยเชื้อโกรแบคทีเรีย
- ค. การจับเชื้อโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกจากแคลลัสด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนำมาเชื้อแล้ว
- ง. การเลี้ยงร่วมกับเชื้อโกรแบคทีเรียบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มีสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
- จ. ลักษณะแคลลัสสับุดำ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์
- ฉ. ลักษณะแคลลัสสับุดำที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์
- ช. ลักษณะแคลลัสสับุดำที่ผ่านการถ่ายยีน เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำขอดนาน 4 สัปดาห์

6. การตรวจวิเคราะห์สปีดที่ได้รับการถ่ายยีน

6.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

จากการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของแคลลัสสปีดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีชีวิตรอดได้บนอาหารคัดเลือก และจากแคลลัสสปีดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แล้วนำดีเอ็นเอนี้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *EPSPs* จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของยีน *EPSPs* (ภาพที่ 11 ก) ซึ่งจากการตรวจสอบผลของแคลลัสสปีดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนจำนวน 9 โคลน พบโคลนที่มีแถบดีเอ็นเอดังกล่าวจำนวน 3 โคลน คือ โคลนที่ 3 8 และ 9

6.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในแคลลัสสปีดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

การตรวจสอบผลการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ภายในจีโนมของสปีด โดยนำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสสปีดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีน โคลนที่ 1-9 มาตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization โดยการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ของยีน *EPSPs* ที่ติดฉลากด้วยสารไรรังสี digoxigenin (DIG) แล้วนำไปลงบนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray นาน 60 นาที ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบกับดีเอ็นเอเป้าหมายจากปฏิกิริยาพีซีอาร์จะปรากฏเป็นแถบสีดำบนแผ่นฟิล์ม จากผลการทดลอง พบแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มตรงกับแถบดีเอ็นเอของยีน *EPSPs* ที่มีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบสในโคลนที่ 3 8 และ 9 (ภาพที่ 11 ข) ซึ่งมีขนาดเดียวกันกับแถบดีเอ็นเอของยีน *EPSPs* ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (positive control) และไม่พบแถบสีดำในแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและน้ำกลั่น (negative control) จึงสามารถยืนยันได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นยีน *EPSPs* จริง

สำหรับโคลนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *EPSPs* จำนวน 6 โคลน ซึ่งคิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์นั้น เหตุผลที่แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก อาจเนื่องมาจากในระหว่างการคัดเลือกมีแคลลัส

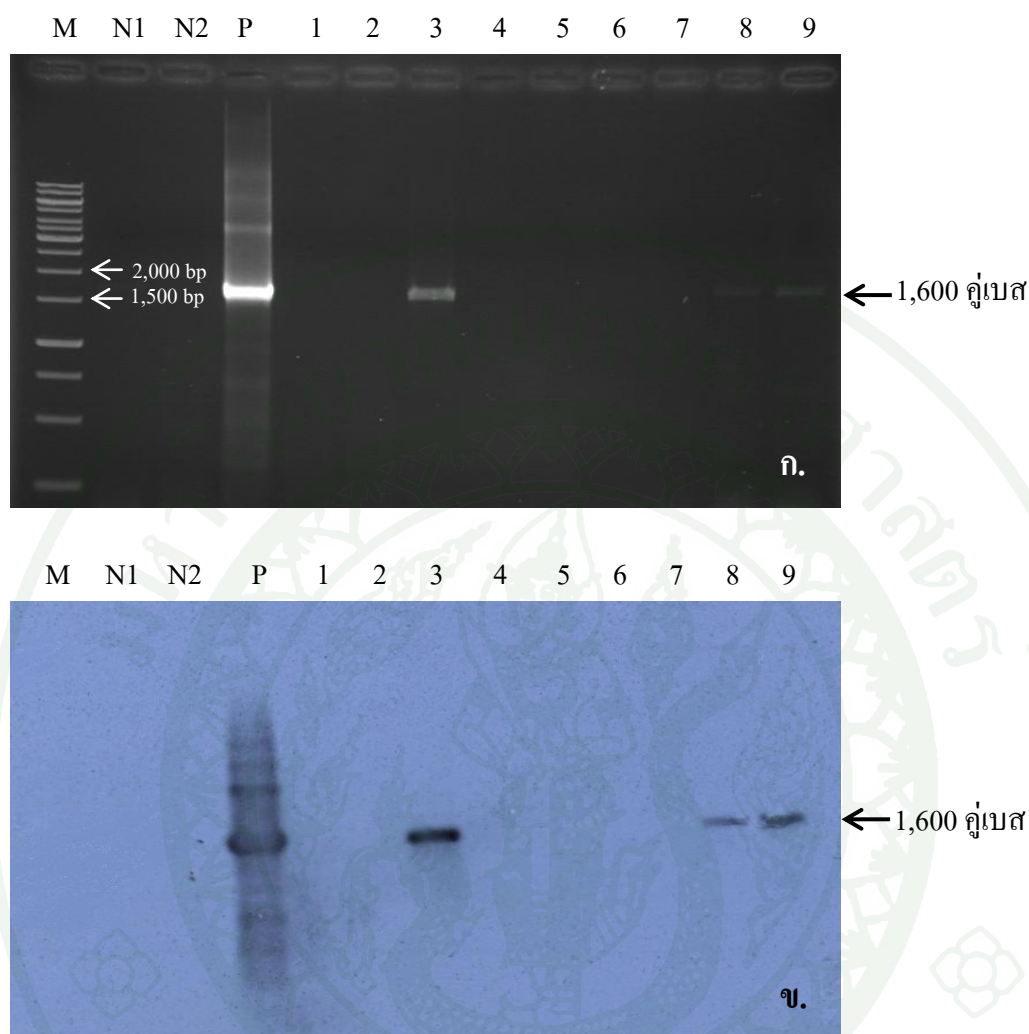
บางส่วนที่อยู่ด้านบนไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ส่งผลให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเรียกปัญหาที่เกิดขึ้นในลักษณะเช่นนี้ว่าการ escape ของเนื้อเยื่อ โดยปัญหานี้มักจะพบได้บ่อยครั้งในระบบการถ่ายยีนหลาย ๆ การทดลอง เช่น Wang *et al.* (2005) ถ่ายยีน *TSase* เข้าสู่อ้อยโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งมียีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก จากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนของพืชที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติมสาร phosphinothricin (PPT) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของพืชที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเท่านั้นที่พบแถบดีเอ็นเอ ส่วนอีก 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชที่ escape จากการคัดเลือก Hoa *et al.* (2008) ถ่ายยีน *bar* ที่ถูกบรรจุอยู่ในพลาสมิด pZY 102/pTF 102 เข้าสู่ถั่วเหลืองสายพันธุ์ PC 19 โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย เมื่อตรวจสอบพืชที่มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern analysis พบว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และ Xu *et al.* (2008) ถ่ายยีน *CryIA(c)* เข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอ้อยด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิด pGCryIA(c) ที่มียีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก แล้วตรวจสอบผลการถ่ายยีนหลังการคัดเลือกด้วยเทคนิค nested PCR พบว่า จากอ้อยทั้งหมด 207 ต้น มีเพียง 9 ต้นที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีน *CryIA(c)* ซึ่งให้เหตุผลว่า การเกิดขึ้น escape จำนวนมากอาจเนื่องมาจากการคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนล่าช้าเกินไปจึงส่งผลให้แคลลัสอ้อยสามารถตั้งตัวและฟื้นฟูตัวเองได้ก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก

Parrott *et al.* (1989) พบว่า ภายหลังการถ่ายยีน *zein* และยีน *nptII* โดย *A. tumefaciens* เข้าสู่ใบเลี้ยงของถั่วเหลือง พบว่ามีประสิทธิภาพการเกิดขึ้นที่ต่ำมาก เพียง 3 ต้น เมื่อนำต้นที่ได้จากการคัดเลือกมาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern hybridization กลับไม่พบการมีอยู่ของยีน *zein* และยีน *nptII* ในต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน และ Almeida *et al.* (2003) ถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เข้าสู่ใบเลี้ยงของสัสม พบว่า มีการเจริญเติบโตของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกจำนวนมาก ซึ่งอธิบายเหตุผลของการตรวจสอบพบเพียงยีน *VP1* หรือยีน *hpt* เพียงอย่างเดียวนั้นอาจเกิดจากความไม่เสถียรของ T-DNA ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ (rearrangement) ของลำดับเบสที่อยู่บน T-DNA ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนที่ยีน *VP1* หรือยีน *hpt* ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีพีซีอาร์

นอกจากนี้ Durand-Tardif *et al.* (1985) รายงานว่า ภายหลังจากการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไปเป็นระยะเวลานาน และพืชมีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์ใหม่ ทำให้มีโอกาสดียีนที่ถ่ายเข้าไปบางส่วนขาดจะหายไปในช่วงนั้น สังเกตได้จากการกลับมาตรวจสอบต้นที่เคยตรวจ

พบยีน เมื่อขยายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นมีบางต้นที่ได้ไม่มียีนอยู่หรือตรวจพบเพียงยีนเดียว หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางส่วนของยีนที่อยู่บน T-DNA โดยกลไกของแบคทีเรียในขณะที่ส่งถ่ายชิ้น T-DNA เมื่อแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์พืชทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีพีซีอาร์





ภาพที่ 11 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* จากแคลลัสสบูดำที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ก.) และ Southern PCR hybridization (ข.) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *EPSPs* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส เมื่อทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *EPSPs*

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas)

N1: dH₂O

N2: จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสสบูดำที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P: พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (positive control)

1-9: ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสสบูดำที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเป็นแม่แบบ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นตั้งแต่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. แคลลัสสปูดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นตั้งแต่ 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดได้ปกติ ดังนั้น การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำมาใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำ
3. แคลลัสสปูดำไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารไกลโฟเสทความเข้มข้นตั้งแต่ 1-4 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จึงเหมาะสำหรับใช้ในการคัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน
4. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมกับการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียจากการตรวจสอบผลการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* พบว่า การเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อที่ 1:20 ใช้เวลาปลูกเชื้อมานาน 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อมานาน 2 วัน ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยพื้นที่แคลลัสสปูดำที่ติดสีน้ำเงินจากการทำ GUS histochemical assay มากที่สุด
5. การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสปูดำพันธุ์โคราชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุ พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่า มีแคลลัสที่สามารถมีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกจำนวน 9 ชิ้น แต่เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบโคลนที่มียีน *EPSPs* จำนวน 3 โคลน และเมื่อนำโคลนที่ได้ทั้งหมดมายืนยันผลโดยวิธี Southern PCR hybridization ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe)

ที่จำเพาะกับยีน *EPSPs* พบว่า มียีน *EPSPs* อยู่จริง แต่แคลลัสของทั้ง 3 โคลน มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า และไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

ข้อเสนอแนะ

จากการถ่ายยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชเข้าสู่แคลลัสสบูดำในครั้งนี้ ประสบความสำเร็จในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบูดำโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และสามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบูดำได้ แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์จากแคลลัสสบูดำดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic calli) ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากขึ้นตอนหนึ่งสำหรับการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม

การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนด้านสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่แคลลัสสบูดำในโอกาสต่อไปนั้น ควรปรับปรุงระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังจากการถ่ายยีน โดยควรย้ายแคลลัสที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสให้เจริญเติบโตก่อนที่จะย้ายไปเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรชักนำยอดและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป

อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการถ่ายยีนอื่น ๆ หรือการพัฒนาในด้านทานสารกำจัดวัชพืชเป็นยีนเครื่อง หมายคัดเลือกต่อไปได้ โดยจะต้องมีการศึกษาและพัฒนากระบวนการคัดเลือก รวมทั้งระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังจากการถ่ายยีนแก่แคลลัสสบูดำให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น หรือการเลือกชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีกว่าการใช้แคลลัส สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะนำไปสู่ความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. 2552. สถิติพลังงานที่สำคัญของประเทศไทยประจำปี 2552. แหล่งที่มา:
<http://www.energy.go.th/?q=node/315>, 24 สิงหาคม 2553.

กัญจนนา แซ่เตียว, รักชนก โคโต, สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์, สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ
จันทร์เปรม. 2549. การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของ *Stylosanthes hamata*
และกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอเซียสกุลในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการถ่ายยีน. ว. วิทยาศาสตร์
เกษตร. 37: 137-144.

กล้าณรงค์ ศรีรอด, ปฐมา จาตุกานนท์, ศิริลักษณ์ เลี้ยงประยูร และ L. Vaysse. 2548. สบู่ดำ-พืช
ศักยภาพสำหรับไบโอดีเซล. แหล่งที่มา:
http://www.rdi.ku.ac.th/exhibition/Year2548/01-KasetNational/Project/index_66.htm,
24 สิงหาคม 2553.

กรีก นฤทุม. 2549. ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของต้นสบู่ดำ, น. 12-17. ใน ชำนาญ จัตรแก้ว และ
คณะ. เอกสารวิชาการ : สบู่ดำพืชพลังงาน. พันธุ์ พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

กุสุมา รอดแพ้วพล. 2554. การถ่ายยีนต้านทานสารไกลโฟเสตเข้าสู่อ้อย (*Saccharum
officinarium* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินตังเอนด์พับลิชชิ่ง,
กรุงเทพฯ. 283 น.

ทวีศักดิ์ อุ่ณจิตติกุล. 2548. สบู่ดำ พืชพลังงานสารพัดประโยชน์. บริษัท วชิระ จำกัด, กรุงเทพฯ.
99 น.

ทศพล พรพรหม. 2545. สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 274 น.

นันท์นภัส เทพสำราญ, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ และ อารีย์ ทองภักดี. 2549. การชักนำให้เกิด แคลลัสและเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). ใน รายงานการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 6. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ณ โรงแรม โลตัส ปางสวนแก้ว, เชียงใหม่.

นุชจรี ทัดเศษ. 2551. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA kinetin TDZ NAA และ IBA ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประโยชน์ ดันติเจริญศ. 2549. ประโยชน์ด้านอื่นๆของต้นสบู่ดำ, น. 93-98. ใน ชำนาญ ฉัตร แก้วและคณะ. เอกสารวิชาการ : สบู่ดำพืชพลังงาน. พันนี้ พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ปรีชา มนทกานติกุล และ สุทธิพร ภักธชากุล. 2549. ยาด้านจุลชีพกลุ่มเซฟาโลสปอริน (Therapeutic review of cephalosporins). แหล่งที่มา:
http://www.thaihp.org/index.php?option=other_detail&lang=th&id=15&sub=26,
20 กรกฎาคม 2554.

ศิริวรรณ บุรีคำ และ รุ่งทิพย์ กาวิดา. 2550. การเพาะเลี้ยงสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) ในสภาพปลอดเชื้อ, น. 130-135. ใน โครงการสัมมนาวิชาการ เรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมนา เหลืองจิติกานูจนา. 2550. การถ่ายยีน *VPI* ของโรคไวรัสปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่หน่อชำชำโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุริรัตน์ เย็นซ้อน. 2553. ปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิก แคลลัสปลัสม์น้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, จีรัตน์ ผลจันทร์, ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, เสดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2539. การถ่ายยีนในถั่วเขียว. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 30: 303-311.

สนธิชัย จันทน์เปรม. 2543. เทคนิคการถ่ายยีนกับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, น. 109-111. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13 : เทคโนโลยีใหม่พันธุ์พืชใหม่ ระหว่างวันที่ 13-14 ธันวาคม. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

อภิรัฐ บัณฑิต. 2552. การศึกษาการแข่งขันของวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืชในสับด้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อารีย์ วรบุญวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์อดิสรณ์, กรุงเทพฯ.

Arash, R., A.A. Maheran, A.R. Azmi, A.S.N. Akmar, K. Hossein, T.S.M. Hossein, M. Bagher and J. Nobandegani. 2010. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and shoot regeneration after co-cultivation of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. *capitata*) cv. KY Cross with *AtHSP101* gene. **Sci. Hort.** 124: 1-8.

Arencibia, A.D., E.R. Carmona, P. Tellez, M.T. Chan, S.M. Yu, L.E. Trujillo and P. Oramas. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Trans. Res.** 7: 213-222.

Akbarzadeh, A., F. Kordbacheh, M. Jafari and A.H. Salmanian. 2010. A binary vector for *Agrobacterium* mediated plant transformation with new glyphosate tolerant gene as a selectable marker. **Biharean Biol.** 4: 19-29.

Almeida, W.A.B., F.A.A.M. Filho, B.M.J. Mendes, A. Pavan and A.P.M. Rodriguez. 2003.

Agrobacterium-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyls segments. **Sci. Agric.** 60: 23-29.

Barrett, C. and A.C. Cassells. 1994. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 36: 169-175.

Cheng, M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiol.** 115: 971-980.

Cheng, M., T. Hu, J. Layton, C.N. Liu and J.E. Fry. 2003. Desiccation of plant tissues post *Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** 39: 595-604.

Cogging, J.R. 1986. Enzymology and molecular biology as aids for the invention and improvement of herbicide, pp. 101-110. **In Proceedings of a Symposium Organised by the British Crop Protection Council with the Support of the Society of Chemical Industry.** Biotechnology and Crop Improvement and Protection BCPC Monograph No. 34. Churchill College, Cambridge.

Da Câmara Machado, A., N.S. Frick, R. Kremen, H. Katinger and M. Laimer da Câmara Machado. 1997. Biotechnological approaches to the improvement of *Jatropha curcas*. **In Proceeding Jatropha 97. Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas.** Gübitz GM, Mittelbach M, Trabi M (Eds), Managua, Nicaragua.

Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R. N. Beachy and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Mol. Breed.** 7: 25-33.

- De la Riva, G.A., J.G. Cabrela, R.V. Pradon and C.A. Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **E. J. Biot.** 1: 1-16.
- Doyle, J.J. and J.J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 12: 13-15.
- Duke, S.O. 1985. Effect of herbicides on nonphotosynthetic biosynthetic process, pp. 91-112. In S.O. Duke., ed. **Weed Physiology**, Vol. 2. CRC Press Inc., Boca Roton, Florida.
- Duke, J.A. 1988. **CRC Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 253-254.
- Durand-Tardif, M., R. Broglic, J. Slightom and D. Tepfer. 1985. Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*. **J. Mol. Biol.** 186: 557-564.
- Fellman, C.D., P.E. Read and M.A. Hosier. 1987. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **Hort. Sci.** 22: 1197-1200.
- Finnegan, J. and D. MacElroy. 1994. Transgenic inactivation: plants fight back!. **Bio/Tech.** 12: 883-888.
- Fiola, J.A., A. Mahmoud, M.A. Hassan, H.J. Swartz, R.H. Bors and R. McNicols. 1990. Effects of thidiazuron, light fluence rate and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 20: 223-228.
- Forlani, G., B. Parisi and B. Nielsen. 1994. 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase from *Zea mays* cultured cells. **Plant Physiol.** 105: 1107-1114.

- Frame, B.R., H. Shou, R.K. Chikwamba, Z.I. Zhang, C.I. Xiang, T.M. Fonger, S.E. Pegg, B. Li, D.S. Nettleton, D. Pei and K. Wang. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiol.** 129: 13-22.
- Gao, Z., X. Xie, Y. Ling, S. Muthukrishnan and H.G. Liang. 2005. *Agrobacterium tumefaciens* transformation using a mannose selection system. **Plant Biot. J.** 3: 591-597.
- Hammerschlag, F.A., R.H. Zimmerman, U.L. Yadava, S. Hunsucker and P. Gercheva. 1997. Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explant and on shoot regeneration. **Amer. Soc. Hort. Sci.** 122: 758-763.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. **Plant J.** 6: 271-282.
- Hoa, T.T.C., T.V. Hai and L.C. Thang. 2008. Transformation efficiencies of the soybean variety PC 19 (*Glycine max* (L.) Merrill) using *Agrobacterium tumefaciens* and the cotyledonary node method. **Omonrice.** 16: 1-8.
- Hood, E.E., S.B. Gelvin, L.S. Melchers and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Trans. Res.** 2: 208-218.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plant. **Science.** 227: 1229-1231.

- Howe, A.R., C.S. Gasser, S.M. Brown, S.R. Padgett, J. Hart, G.B. Parker, M.E. Fromm and C.L. Armstrong. 2002. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. **Mol. Breed.** 10: 153-164.
- Hu, T., S. Metz, C. Chay, H.P. Zhou, N. Biest, G. Chen, M. Cheng, X. Feng, M. Radionenko, F. Lu and J. Fry. 2003. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. **Plant Cell Rep.** 21: 1010-1019.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nat. Biot.** 14: 745-750.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene system. **Plant Mol. Biol. Rep.** 5: 387-405.
- Joshi, M., A. Mishra and B. Jha. 2011. Efficient genetic transformation of *Jatropha curcas* L. by microprojectile bombardment using embryo axes. **Ind. Crop. Prod.** 33: 67-77.
- Junyan, Z., H. Ma, F. Guo and X. Lao. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 36: 73-79.
- Kikkent, I.R. 1993. The Biolistic[®] PDS-1000/He device. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 33: 221-226.
- Klein, T.M., E.D. Wolf, R. Wu and J.C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acid into living cells. **Nature.** 327: 70-73.
- Kumlehn, J., L. Serazetdinora, G. Hensel, D. Becker and H. Loez. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen culture with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Biot. J.** 4:251-258.

- Lee, H.J., G.J. Lee, D.S. Kim, J.B. Kim, J.H. Ku and S.Y. Kang. 2008. Selection and physiological characterization of glyphosate-tolerant zoysiagrass mutants derived from a gamma ray irradiation. **Kor. J. Hort. Sci. Technol.** 26: 454-463.
- Li, M., H. Li, H. Jiang, X. Pan and G. Wu. 2007. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 92: 173-181.
- Lin, J.J., A.N. Garcia and J. Kuo. 1995. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Sci.** 109: 171-177.
- Mannan, A., T.N. Syed and B. Mirza. 2009. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. **Pak. J. Bot.** 41: 3239-3246.
- Manickavasagam, M., A. Ganapathi, V.R. Anbazhagan, B. Sudhakar, N. Selvaraj, A. Vasudevan and S. Kasthuriengan. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Rep.** 23: 134-143.
- Mathias, R.J. and L.A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. THELL). **Plant Sci.** 46: 217-223.
- Mathias, R.J. and C. Mukasa. 1987. The effect of cefotaxime on the growth and regeneration of callus from four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) **Plant Cell Rep.** 6: 454-457.
- May, G.D., R. Afza, H.S. Mason, A. Wiecko, F.J. Novak and C.J. Arntzen. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/Tech.** 13: 486-492.

- McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Tech.** 6: 923-926.
- Men, S.Z., X.T. Ming, R.W. Liu, C.H. Wei and Y. Li. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 75: 63-71.
- Mittal, P., S.S. Gosal, A. Senger and P. Kumar. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. **Physiol. Mol. Biol. Plants.** 15: 257-265.
- Morikawa, H., A. Iida and Y. Yamada. 1989. Transient expression of foreign genes in plant cell and tissue obtained by a simple biolistic device (particle-gun). **Applied Microbiol. Biotech.** 31: 320-322.
- Mulwa, R.M.S. and L.M. Mwanza. 2006. Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. **African J of Biotech.** 5: 396-404.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Nafziger, E.D., J.M. Widholm, H.C. Steinrucken, and J.L. Killmer. 1984. Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. **Plant Physiol.** 76: 571-574.
- Neureby, B., K. Billing and R. Wyndaele. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Sci.** 123: 169-177.
- Oard, J. 1993. Development of an airgun device for particle bombardment. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 33: 247-250.

Okkels, E.T. and M.G. Pedersen. 1988. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta. Hort.** 225: 199-207.

Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas* : and oil plant of unfilled promise. **Biomass and Bioener.** 19: 1-15.

Öz, M.T., F. Eyidogan, M. Yücel and H.A. Öktem. 2009. Optimized selection and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea cotyledonary nodes. **Pak. J. Bot.** 41: 2043-2054.

Parrott, W.A., L.M. Hoffman, D.F. Hildebrand, E.G. Williams and G.B. Collins. 1989. Recovery of primary transformants of soybean. **Plant Cell Rep.** 7: 615-617.

Pius, J., L. George, S. Eapen and P.S. Rao. 1993. Enhanced plane regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 32: 91-96.

Pletsch, M. And B.V. Charlwood. 1997. Accumulation of diterpenoids in cell and root-organ culture of *Jatropha* species. **Plant Physiol.** 150: 37-45.

Popelka, J.C. and F. Altpeter. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereal* L.). **Mol. Breed.** 11: 203–211.

Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama and K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. **Plant Cell Rep.** 15: 727-730.

Rajore, S., J. Sardana and A. Batra. 2002. *In vitro* cloning of *Jatropha curcas* L. **Plant Biol.** 29: 195-198.

- Roudsari, M.F., A.H. Salmanian, A. Mousavi, H.H. Sohi and M. Jafari. 2009. Regeneration of glyphosate-tolerant *Nicotiana tabacum* after plastid transformation with a mutated variant of bacterial *aroA* gene. **Iranian J. Biotech.** 7: 247-253.
- Shah, P., N. Khare, S. Orey, M. Arif and Z. Ahmed. 2010. *In vitro* plant regeneration from microshoot in *Jatropha curcas*. **Int. J. Agric. Food Sci. Tech.** 1: 63-72.
- Soham, T., G. Hipal, G. Mayank, G. Nikhil, P. Prasad, G. Girish, K.K. Vamsia and M.P. Reddy. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. **Agric. Sci.** 1: 11-20.
- Spencer, T.M., J.V. O'Brien, W.G. Start, T.R. Adams, W.J.K. Gordon and P.G. Lemaux. 1992. Segregation of transgenes in maize. **Plant Mol. Biol.** 18: 201-210.
- Sujatha, M. and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jathropa curcas*. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 44: 135-141.
- Sundar, I.K. and N. Sakthivel. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. **J. Plant Physiol.** 165: 1698-1716.
- Suwanketnikom, R., T. Pronprom, S. Chanprem and P. Srinives. 1992. Soybean plant and tissue culture selection for glyphosate tolerance. **Thai Agric. Res. J.** 10: 52-57.
- Takenchi, Y., M. Dotson and N.T. Keen. 1992. Plant transformation : a simple particle bombardment device based on flowing helium. **Plant Mol. Biol.** 18: 835-839.
- Tong, X.H., M.K. Daud and S.J. Zhu. 2010. Selection and characterization of a novel glyphosate-tolerant upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutant (R1098). **Plant Breed.** 129: 192-196.

- Trivedi, S., H. Gaudani, M. Gupta, N. Gupta, P. Patil, G. Gupta, K.V. Krishna and M.P. Reddy. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. **Int. J. Agric. Sci.** 1: 11-20.
- Uze, M., J. Wunn, J. Pounti-Kaelas, I. Potrykus and C. Sauter. 1997. Plasmolysis of precultured immature embryos improves *Agrobacterium* mediated gene transfer to rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Sci.** 130: 87-95.
- Van Nieuwkerk, J.P., R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of appleshoot proliferation *in vitro*. **Hort. Sci.** 21: 516-518.
- Vogell, J.P., D.F. Garvin, O.M. Leongl and D.M. Hayden. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. **Plant Cell, Tiss. Org. Cul.** 84: 199-211.
- Wang, S.Y., J.L. Ji, T. Sun and M. Faust. 1986. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator thidiazuron. **Phytochem.** 25: 311-317.
- Wang, Z.-Z., S.-Z. Zhang, B.-P. Yang and Y.-R. Li. 2005. Trehalose synthase gene transfer mediated by *Agrobacterium tumefaciens* enhances resistance to osmotic stress in sugarcane. **Sugar Tech.** 7: 49-54.
- Weber, S., W. Friedt, N. Landes, J. Molinier, C. Himber, P. Rousselin, G. Hahne and R. Horn. 2003. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. **Plant Cell Rep.** 21: 475-482.
- Widholm, J.M., A.R. Chinnala, J.H. Ryu, H.S. Song, T. Eggett and J.E. Brotherton. 2001. Glyphosate selection of gene amplification in suspension culture of 3 plant species. **Physiol. Plant.** 112: 540-545.

- Wu, H., C. Sparks, B. Amoah and H D. Jones. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*- mediated genetic transformation of wheat. **Plant Cell Rep.** 21: 659-668.
- Xu, J.S., S. Gao, L. Xu and R. Chen. 2008. Construction of expression vector of *CryIA(c)* gene and its transformation in sugarcane. **Sugar Tech.** 10: 269-273.
- Xu, L., U. Najeeb, W.Q. Shen, G. Jilani, M. Rasheed and W.J. Zhou. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated BT gene transformation system in mat rush (*Juncus effuses* L.) **Pak. J. Bot.** 41: 2615-2624.
- Yong, W.T.L., J.O. Abudullah and M. Mahmood. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. **Sci. Hort.** 109: 78-85.
- Zhao, F.-Y., Y.-F. Li and P. Xu. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Zhongmian 35) using glyphosate as a selectable marker. **Biotech. Lett.** 28: 1199-1207.
- Zhou, J.Y. and G. F. Collet. 1989. Studies on cytokinin-activity of thidiazuron I. Effect on callus induction and shoot growth in tissue culture of *Carica pentagona*. **Acta Bot. Bor.-Occ. Sinica.** 9: 203-211.
- Zhou, H., J.W. Arrowsmith, M.E. Fromm, C.M. Hirinaka, M.L. Taylor, D. Rodriguez, M.E. Pajeau, S.M. Brown, C.G. Santino and J.E. Fry. 1995. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. **Plant Cell Rep.** 15:159-163.

Zong, H., S. Wang, C. Ouyang, X. Deng, L. Li, J. Li and F. Chen. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Jatropha curcas* young leaf explant with lateral shoot-induction factor (*LIF*). **Int. J. Agric. Biol.** 12: 891-896.





ภาคผนวก

GUS histochemical assay ดัดแปลงจาก Jefferson (1987)

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

	Final concentration	Reagent mix
0.1 M NaPO ₄ (pH 7.0)	50 mM	10 ml
0.1 M K ₃ Fe(CN) ₆	0.5 mM	0.1 ml
0.1 M K ₄ Fe(CN) ₆	0.5 mM	0.1 ml
0.2 M Na ₂ EDTA (pH 7.0)	10 mM	1.0 ml
dH ₂ O		8.8 ml

2. เตรียม X-gluc substrate โดยซังสาร 5-bromo-4-chloro-3-β-d-glucuronide (X-gluc)

หนัก 5 มิลลิกรัม ใส่ในสารละลาย dimethylformamide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว เก็บใส่ในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน หรือเตรียมเป็น stock เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เติม X-gluc substrate ที่ได้จากข้อ 2 ทั้งหมดลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ปริมาตร 5-8 มิลลิลิตร

4. เติม Triton X-100 ปริมาตร 1.5-2.4 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3 นำไปใส่ภาชนะที่ทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. ทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยเติมสารละลายดังกล่าวให้ท่วมเชื้อเยื่อทดสอบ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนแคลลัสปูดำที่ผ่านการถ่ายยีนที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก
 ตามระหว่างการชักนำให้เกิดยอด เจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรชักนำยอด
 และที่ตรวจพบยีน *EPSPs*

ขั้นตอน	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์
แคลลัสที่นำมาถ่ายยีน	500	100
แคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก	15	3
แคลลัสที่ตายระหว่างการชักนำให้เกิดยอด	6	1.2
แคลลัสที่เจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรชักนำยอด	9	1.8
แคลลัสที่ตรวจพบยีน <i>EPSPs</i>	3	0.6

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายวิชา สิงห์ลอ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	20 กันยายน 2527
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.พิจิตร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	บัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ