ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร — **สาขา**

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา — **ภาควิชา**

เรื่อง การถ่ายยีนเข้าสู่สัก (*Tectona grandis* L.f.) โดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม

Gene Transformation into *Tectona grandis* L.f. *via Agrobacterium tumefaciens*

นามผู้วิจัย นางสาวเยาวพรรณ สนธิกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ศาสตราจารย์พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนเข้าสู่สัก (*Tectona grandis* L.f.) โดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม

Gene Transformation into *Tectona grandis* L.f. *via Agrobacterium tumefaciens*

โดย

นางสาวเยาวพรรณ สนธิกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เยาวพรรณ สนธิกุล 2557: การถ่ายยีนเข้าสู่สัก (*Tectona grandis* L.f.) โดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 141 หน้า

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยในการวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก ซึ่งพบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อสักได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงข้อ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เฉลี่ย 5 ยอดต่อข้อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนในสัก โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่ OD_{600}=1 เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้อที่สร้างบาดแผลโดยการ sonication นาน 10 วินาที ปลูกเชื้อนาน 5 ชั่วโมง และเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน เป็นวิธีการถ่ายยีนในสักที่มีประสิทธิภาพสูง จึงใช้วิธีการนี้ถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (*5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase*; *EPSPs*) เข้าสู่สัก โดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* และคัดเลือกต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนจากความทนทานต่อสารไกลโฟเสทในอาหารคัดเลือก ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* โดยเทคนิค PCR ในต้นสักที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกรุ่น T_0 จำนวน 27 ต้น พบการมีอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* จำนวน 23 ต้น เพิ่มปริมาณยอดสักบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จนได้เป็นยอดรุ่น T_2 แล้วตรวจสอบการถ่ายทอดของยีนในรุ่น T_2 โดยเทคนิค PCR พบว่ามีจำนวน 12 ต้น จาก 109 ต้น ที่มียีนที่สนใจ ซึ่งเมื่อนำต้นออกปลูก และตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization, PCR และ Southern blot hybridization พบว่ามีจำนวน 4 ต้น ที่ได้รับการถ่ายทอดยีน แต่ความสามารถในการทนทานต่อสารไกลโฟเสทไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบการเกิดลักษณะ chimera ในต้นรุ่น T_2

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yaowaphan Sontikun 2014: Gene Transformation into *Tectona grandis* L.f. *via Agrobacterium tumefaciens*. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 141 pages.

There are several parameters involved in teak transformation. In this study, micropropagation of teak was studied. It was found that callus was successfully induced but plantlets could not be regenerated. Multiple shoots were successfully induced from node tissue cultured on MS solid medium supplemented with 3.0 mg/l BA yielded 5 shoots per node. For gene transformation, the optimal conditions were established. *Agrobacterium tumefaciens* harboring pCAMBIA 1304 which contained *β-glucuronidase* (*gus*) as reporter gene and *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) as selectable marker gene was used. The transient expression as evaluated by GUS histochemical assay demonstrated high percentage of transformation when using *A. tumefaciens* strain EHA 105 (OD_{600} = 1) to transfer gene into node explants in which wounded by sonication for 10 seconds followed by 5 hours inoculated then co-cultivated for 3 days. The optimal parameters were then applied to the transformation of *EPSPs* gene (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*) into teak. The plant vector, pCAM-EPSPS 1304, which contained *EPSPs* gene was used. Explants were transferred onto glyphosate containing medium. After selection, 27 plants survived. The PCR analysis confirmed that 23 putative transgenic lines contained both *gus* and *EPSPs* genes. All putative transgenic lines were multiplied on MS medium containing 3.0 mg/l BA to obtain 109 T_2 planted. The PCR analysis confirmed the existence of the transgenes in 12 out of 109 T_2 plantlets. They were then transplanted in greenhouse and analysed by dot blot hybridization, PCR and Southern blot hybridization. The results confirmed that 4 lines were transgenic but they were not consistency in glyphosate resistance. PCR analysis for the present of the transgenes in these 4 transgenic lines revealed that they were chimeras.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาแนะนำ และให้คำปรึกษา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาด้านการค้นคว้าวิจัย ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โฆสิตรัตน ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลนาถ อบสุวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ และมอบความรู้ด้านต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีนทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา และให้คำปรึกษาจนสามารถจัดทำวิทยานิพนธ์ได้อย่างสมบูรณ์ ประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

เยาวพรรณ สนธิกุล

กรกฎาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	54
สรุปและข้อเสนอแนะ	118
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	120
ภาคผนวก	138
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	141

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสที่ชักนำจากข้อ และฐานใบของสักสายต้น 16C7 22C53 และ 26C33 บนอาหารสูตรต่างๆ เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	56
2	การเกิดแคลลัสจากฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	59
3	การเกิดแคลลัสจากฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	60
4	ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจากข้อของสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	62
5	ผลของ silver nitrate หลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ silver nitrate เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	63
6	ผลของ adenine sulfate เมื่อเพาะเลี้ยงข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ adenine sulfate เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	65
7	ผลของสูตรอาหาร และ IBA ต่อการเกิดรากของยอดสัก เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์	71
9	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสท เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์	74
10	ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วนต่างๆ ของสัก ที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	77
11	ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการสร้างยอดจากข้อ และการเกิดแคลลัสจากฐานใบของสัก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	79
12	ผลของชิ้นส่วนพืชต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ	81
13	ผลของการสร้างบาดแผลบนชิ้นส่วนฐานใบ และข้อสักต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ	84

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ผลของสายพันธุ์เชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ	86
15	ผลของความเข้มข้นเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ในเนื้อเยื่อสัก หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ	87
16	ผลของระยะเวลาในการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในเนื้อเยื่อสัก ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ	89
17	ผลของระยะเวลาเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในเนื้อเยื่อสัก ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ	90
18	ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *EPSPs* ในต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน กับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI	98
19	จำนวนต้นสักที่เกิดขึ้นใหม่จากการชักนำในรุ่น T_1 และ T_2 และการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในรุ่น T_2 ด้วยเทคนิค PCR	104
20	ผลการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิค PCR ของใบจากต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ต้นที่ 7 8 9 และ 10 ภายหลังการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทเป็นระยะเวลา 1 เดือน	116
21	ผลการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค PCR กับชิ้นส่วนต่างๆ ของใบจากต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ต้นที่ 9 และต้นที่ 10 ซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามียีน *gus*	116

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	140
2	องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani Media (LB)	141

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่พืช	14
2	การสังเคราะห์สารจาก shikimate pathway	22
3	แผนที่โครงสร้างและขนาดพลาสมิด pCAMBIA1304	31
4	ต้นสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS อายุ 2 เดือน	32
5	ชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาบนไนลอนเมมเบรน	52
6	ลักษณะแคลลัสสักสายต้น 22C53 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	57
7	ลักษณะยอดสักที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตรต่างๆ	66
8	ต้นอ่อนของสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS และ MS ร่วมกับการเติม IBA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	68
9	ลักษณะชิ้นส่วนสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่ความเข้มข้น 0 – 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ (ศรชี้คือชิ้นส่วนสักบางส่วนที่ยังมีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม hygromycin	72
10	ลักษณะชิ้นส่วนสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 0 – 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ (ศรชี้คือชิ้นส่วนสักบางส่วนที่ยังมีชีวิต เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสท)	75
11	ลักษณะชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงินจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว เมื่อตรวจโดยวิธี GUS histochemical assay	82
12	การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* และ *gus* ใน *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธี PCR	92
13	แผนผังขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนข้อของสักโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*	94

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การเกิดยอดใหม่หลังการคัดเลือกโดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร	95
15	การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* ในจีโนมของเนื้อเยื่อส่วนใบจากยอดสักที่เจริญบนอาหารคัดเลือก จำนวน 27 ต้น โดยใช้เทคนิค PCR	99
16	แผนที่โครงสร้างพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304	100
17	การแสดงออกของยีน *gus* แบบถาวรของชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นสักรุ่น T_2 ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก โดยวิธี GUS histochemical assay	106
18	การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* (ก) และยีน *EPSPs* (ข) ในต้นสักรุ่นที่ 2 (T_2) ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค dot blot hybridization	107
19	ต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ	109
20	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Tg-NDPK* (ก) ยีน *EPSP* (ข) และยีน *gus* (ค) ในต้นสักรุ่น T_2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นต้นแบบ	110
21	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *EPSPs* กับจีโนมของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern blot hybridization	112
22	ลักษณะใบสักหลังได้รับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 3.6 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาต่างๆ	114
23	ลักษณะใบจากยอดที่เจริญใหม่ของต้นสักภายหลังได้รับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (ซ้าย) กับใบปกติของต้นสักที่ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (ขวา)	117

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การถ่ายยีนเข้าสู่สัก (*Tectona grandis* L.f.) โดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม

Gene Transformation into *Tectona grandis* L.f. *via Agrobacterium tumefaciens*

คำนำ

การถ่ายยีนในพืชเป็นเทคนิคหนึ่งที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อวงการเกษตร และต่อเกษตรกรในอนาคต แม้ว่าขณะนี้ประเทศไทยยังไม่มีนโยบายให้ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Organisms, GMOs) แต่ในอนาคตด้วยการได้รับความรู้ และความเข้าใจของผู้บริโภค การเข้าถึงเทคโนโลยีของผู้บริโภค และความต้องการผลผลิตทางการเกษตรที่เพิ่มสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก จะเป็นแรงผลักดันให้มีการอนุญาตให้มีการปลูกพืช GMOs ในแปลงปลูกได้ พืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะเปิดแนวทางใหม่ของการพัฒนาด้านการเกษตรที่สามารถเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

สักเป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเนื้อไม้มีสีและลวดลายที่สวยงามเป็นลักษณะเฉพาะของไม้สัก อีกทั้งยังมีความแข็งแรง ทนทานจากการเข้าทำลายของแมลงและเชื้อรา จึงมีการนำไม้สักไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง (สุทัศน์, 2536) ในอดีตไม้สักจัดเป็นสินค้าส่งออกที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศรองจากข้าว แต่หลังจากที่ต้นสักถูกตัดโค่นออกจากป่าธรรมชาติเป็นจำนวนมาก ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของป่าสักในธรรมชาติลดลง มีการนำเข้าไม้สักจากประเทศเพื่อนบ้านเพื่อใช้ในงานอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น จนรัฐบาลต้องประกาศปิดป่า ไม้สักจึงกลายเป็นไม้ต้องห้าม แต่ด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวของไม้สัก รัฐบาลจึงมีการรณรงค์ปลูกป่าสักเพิ่มขึ้นทุกปี แต่ปัญหาที่พบในป่าสักอายุน้อยคือ วัชพืช โดยวัชพืชจะแก่งแย่งอาหารในดิน และส่วนที่อยู่เหนือดินจะบังแสงอาทิตย์ทำให้ต้นอ่อนได้รับธาตุอาหารและแสงไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ส่วนปัญหาที่พบในป่าปลูก คือลักษณะการปลูกเป็นพืชเชิงเดี่ยว และทำในพื้นที่กว้าง ผลที่ตามมาคือ ปัญหาเรื่องโรค แมลง ที่เข้าทำลายต้นสัก ทำให้สักเจริญได้ไม่ดี เนื่องจากเนื้อไม้ภายในถูกทำลาย เมื่อถึงรอบตัดฟันยังพบว่าเนื้อไม้เป็นโพรง ทำให้นำมาใช้ประโยชน์ได้น้อย แนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือการจัดการการกำจัดวัชพืชอย่างเหมาะสม และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างสายพันธุ์สักที่ต้านทานหรือทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช โรคและแมลง แต่การผสมพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) นั้น มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ระยะเวลาในการบาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของดอกสั้นเพียง 1 วัน ทำให้ยากต่อการผสม และยังใช้ระยะเวลานานตั้งแต่การผสมเกสรจนติดเมล็ด เมล็ดมีอัตราการงอกต่ำไม่สม่ำเสมอ และต้นสักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (low genetic variability) ซึ่งเป็นข้อจำกัดหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ (Gyves and Rugini, 2009) ดังนั้นจึงได้มีการนำวิธีการทางพันธุวิศวกรรม หรือการถ่ายยีนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เพื่อสร้างสายพันธุ์สักพันธุ์ดีที่ต้านทานหรือทนทานต่อวัชพืช แมลงและโรค หรือมีอัตราการเจริญเติบโตสูง และให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปลูกป่าสักเชิงเศรษฐกิจได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์สักโดยใช้เทคนิคการถ่ายยีนนี้ได้มีการศึกษาในหลายประเทศ แต่ความสำเร็จในการถ่ายยีนมีเพียงรายงานจาก Forest Research Institute Malaysia ประเทศมาเลเซีย และจาก Bandung Institute of Technology ประเทศอินโดนีเซีย ส่วนในประเทศไทยนั้นยังไม่มีรายงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่สัก ดังนั้นการศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่สักจึงมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์สักในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงเทคนิค และวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่สักด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ โดยใช้ยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *EPSPs* เป็นยีนคัดเลือก แล้วตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อประเมินประสิทธิภาพการถ่ายยีน และการแสดงออกของยีน โดยเทคนิคที่พัฒนาได้นี้สามารถนำไปใช้ในการถ่ายยีนที่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริง เพื่อเป็นการสร้างต้นสักต้นแบบที่สามารถนำมาปลูกในธรรมชาติได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สัก (*Tectona grandis* L.f.) โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefacienc*e เป็นพาหะ

2. เพื่อถ่ายยีนเข้าสู่สักโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefacienc*e เป็นพาหะ ใช้ยีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน *EPSPs* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่มไกลโฟเสท เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของสัก

ต้นสัก (teak, *Tectona grandis* L.f.) จัดอยู่ในวงศ์ Labiatae (Verbenaceae) ซึ่งเป็นแหล่งของไม้ที่นิยมนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากคุณสมบัติของเนื้อไม้ที่มีความแข็งแรง ทนทาน และมีลวดลายของไม้ที่สวยงาม นอกจากนี้สักยังมีการสร้างสาร tectoquinone ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อปลวก และเห็ดราบางชนิด ทำให้สิ่งก่อสร้างที่ใช้ไม้สักมีความคงทนสูง

ต้นสักเป็นไม้ป่าเขตร้อน พบการกระจายได้ทั่วไปในประเทศพม่า ไทย ลาว อินเดีย และบางส่วนในอินโดนีเซีย (White, 1991) ในประเทศไทยพบต้นสักเกิดขึ้นตามธรรมชาติเฉพาะในภาคเหนือ และสามารถพบได้บางส่วนในภาคใต้ แต่คุณภาพของเนื้อไม้จะต่ำกว่าในภาคเหนือ ประเทศไทยสามารถแบ่งไม้สักออกเป็น 5 ชนิด ตามลักษณะของเนื้อไม้ ได้แก่ สักทอง สักหิน สักหยวก สักไข่ และสักขี้ควาย ซึ่งไม้สักทองจัดเป็นพันธุ์ที่ให้คุณภาพของเนื้อไม้ดีที่สุด (สุทัศน์, 2536)

ต้นสักจัดเป็นไม้ยืนต้นที่มีขนาดใหญ่ โตเร็ว มีความสูงเต็มที่ตั้งแต่ 20 เมตรขึ้นไป มีใบเป็นแบบใบเดี่ยวเป็นคู่ๆ ตรงข้ามกัน ขนาดของใบจะลดลงเมื่อต้นสักมีอายุมากขึ้น ต้นสักเป็นไม้ผลัดใบ ใบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีน้ำตาล และร่วงในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม และร่วงหมดในเดือนมกราคมถึงมีนาคม ในระยะนี้ต้นสักจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ แล้วจะเริ่มมีการเจริญด้านความสูงอย่างรวดเร็วในช่วงที่มีฝน ตั้งแต่เดือนเมษายนถึงสิงหาคม โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วงต้นฤดูฝน ส่วนการเพิ่มขนาดของลำต้นพบการเจริญเติบโตสูงในช่วงกลางฤดูฝน แล้วจึงเข้าสู่ช่วงชะลอการเจริญเติบโต และมีการผลัดใบอีกครั้งในเดือนตุลาคม ซึ่งรอบการเจริญเติบโตนี้อาจมีการคลาดเคลื่อน เปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาพพื้นที่ และสภาพอากาศในแต่ละปี (อภิชาติ, 2521) ต้นสักมีดอกสมบูรณ์เพศ ขนาดเล็ก ออกดอกเป็นช่อบริเวณปลายกิ่ง เริ่มออกดอกช่วงเดือนมิถุนายน และจะเริ่มทยอยบานในเดือนกันยายน โดยดอกจะบานในช่วงเช้าและร่วงในตอนเย็นหรือเช้าวันถัดไปหากไม่ได้รับการผสม ต้นสักในธรรมชาติจะออกดอกเมื่อมีอายุประมาณ 5 – 6 ปี (Boonkird, 1966) แต่ในบางครั้งพบว่าต้นสักอายุน้อยในป่าปลูกมีการออกดอกเร็วกว่าปกติ เช่นในประเทศมาเลเซียพบว่าต้นสักในป่าปลูกนั้นออกดอกที่อายุเพียง 3 ปี ซึ่งการออกดอกเร็วของต้นสักนี้ทำให้มีการแตกกิ่งก้านขึ้น และยังทำให้การเจริญเติบโตของต้นลดลง ส่งผลให้ไม้สักที่ได้มีคุณภาพลดต่ำลง (Krishnapillay, 2000) ส่วนผลสักนั้นจัดเป็นผลแบบ drupe

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หรือ stone fruit ผลจะเจริญเต็มที่ในเดือนมกราคม และจะสุกแห้งร่วงตามธรรมชาติประมาณกลางเดือนเมษายน ภายในผลมีช่องบรรจุเมล็ดแบ่งเป็น 4 ช่อง ในการเตรียมต้นกล้าเพื่อปลูกสวนป่านั้น จะใช้ผลสักทั้งผลเป็นเมล็ดพันธุ์ปลูกในแปลงเพาะโดยตรง (อภิชาติ, 2535)

อย่างไรก็ตามไม้สักในประเทศไทยได้รับการยอมรับว่ามีคุณภาพดีระดับโลก ตลาดยังมีความต้องการสูง จึงทำให้ต้นสักในธรรมชาติถูกลอบตัดทำลายเป็นจำนวนมาก และมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการปลูกสร้างสวนป่าเชิงเศรษฐกิจขึ้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าว โดยในปี พ.ศ. 2537 กรมป่าไม้ได้มีการส่งเสริมให้ภาคเอกชนปลูกสวนป่าเพื่อการค้า ทำให้มีพื้นที่การปลูกกระจายอยู่ทั่วประเทศ การปลูกต้นสักมีวิธีการปลูกและการจัดการที่แตกต่างจากการทำสวนผลไม้อื่นๆ คือต้องการผลผลิตด้านเนื้อไม้ ราคาไม้ขึ้นกับคุณภาพ ขนาด และอายุของไม้ ดังนั้นความเหมาะสมของพื้นที่ ค่าใช้จ่ายในการลงทุน รูปแบบการปลูก และการจัดการที่ดีจึงมีความจำเป็นต่อการปลูกสวนป่าสัก โดยเฉพาะการจัดการในสวนป่าสักนับว่ามีความสำคัญมากโดยเริ่มตั้งแต่การจัดการหาต้นพันธุ์ ระยะปลูก พื้นที่ที่เหมาะสม และการบำรุงรักษา ในช่วงแรกการกำจัดวัชพืชในแปลงนับได้ว่ามีความจำเป็นมาก ทั้งนี้เพราะต้นสักต้องการแสงมากในการเจริญเติบโต วัชพืชจะแย่งน้ำ แสงสว่าง และธาตุอาหารในดิน ดังนั้นในแปลงควรปราศจากวัชพืชโดยเฉพาะในช่วง 3 ปีแรก เพื่อช่วยให้ต้นสักสามารถเจริญเติบโตหนีจากวัชพืชได้ การกำจัดวัชพืชอาจทำได้โดยการใช้แรงงานคนในการถากถาง แต่ในการถากถางแต่ละครั้งต้องอาศัยแรงงานซึ่งในปัจจุบันนั้นจำนวนแรงงานน้อย ค่าแรงสูง ทำให้มีต้นทุนค่าแรงงานเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งการถากถางวัชพืชในบางครั้งอาจทำให้เกิดการกระทบกระเทือนต่อระบบรากของต้นสักอายุน้อยได้ ส่งผลให้เกิดการชะลอการเจริญเติบโต และอาจตายได้ วิธีกำจัดวัชพืชอีกวิธีการที่นิยมคือการใช้สารกำจัดวัชพืชฉีดพ่น ทำให้ง่ายต่อการจัดการ ใช้แรงงานน้อย และสามารถกำจัดได้ทั้งวัชพืชก่อนงอก และวัชพืชหลังงอก ซึ่งในปัจจุบันสารกำจัดวัชพืชมีหลากหลายชนิดให้เลือกใช้ มีการลดการตกค้างในธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมสูง แต่ทั้งนี้ในการใช้สารกำจัดวัชพืชควรคำนึงถึงความเข้มข้นของสารที่ใช้ เพราะสารกำจัดวัชพืชบางชนิดเป็นชนิดที่ไม่เลือกทำลาย การนำไปใช้ที่ความเข้มข้นสูงอาจส่งผลต่อพืชปลูกได้ นอกจากนี้อาจมีการใช้เครื่องจักรกลหรือการใช้หลายๆ วิธีการร่วมกัน เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพ และความเหมาะสมกับแต่ละสวนป่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การขยายพันธุ์สัก

การขยายพันธุ์สักมีการใช้ 4 วิธีการคือ การเพาะเมล็ด การติดตา การปักชำ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยที่การเพาะเมล็ดนั้นเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่ได้ผลน้อย เนื่องจากเมล็ดสักนั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ ไม่สม่ำเสมอ อีกทั้งยังมีปัญหาเรื่องลักษณะของต้นที่เจริญจากเมล็ดที่ได้ไม่ตรงตามสายพันธุ์ ดังนั้นการปลูกโดยใช้เมล็ดพันธุ์ปลูกโดยตรงจึงไม่ค่อยนิยม ส่วนการขยายพันธุ์โดยการติดตานั้น เป็นการนำตาของต้นพันธุ์ดีมาติดกับต้นตอ หรือเหง้า แต่อาจพบปัญหาการเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ของต้นตอ และกิ่งตา รวมถึงบริเวณรอยต่อยังเป็นจุดอ่อนที่เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ง่าย เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม้ล้มตายเมื่อมีลมพัดแรง (สุทัศน์, 2536) วิธีการนี้เหมาะสำหรับสวนป่าสักที่ใช้เป็นแหล่งเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากมีการจัดการที่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง สำหรับการขยายพันธุ์โดยการปักชำนั้น เป็นการเลือกชิ้นส่วนของต้นสักสายพันธุ์ดี เช่นลำต้นอายุ 1 ปี เหง้า หรือ ยอดอ่อน มาใช้ในการปักชำ วิธีการนี้มีข้อดีคือเมื่อปลูกแล้วสามารถเห็นผลได้ทันที ต้นสักมีพัฒนาการ และการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจน แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดคือยังไม่สามารถทำได้กับแม่ไม้ ทำได้เฉพาะกับกล้าไม้ เหง้า และยอด จึงต้องใช้เมล็ดสักจำนวนมากเพื่อผลิตกล้าไม้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องอายุกล้าไม้และระยะเวลาที่เหมาะสมในการปักชำอีกด้วย (อภิชาติ, 2535) ดังนั้นจึงมีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ทำให้ได้ต้นตรงตามสายพันธุ์ มีคุณภาพดีเช่นเดียวกับต้นแม่ และสามารถเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ด ปลายยอด และส่วนข้อของแม่ไม้พันธุ์ดี (Gupta *et al*., 1980; Khatri *et al*., 2001; Tiwari *et al*., 2002; Shirin *et al*., 2005; Gyves *et al*., 2007; Akram and Aftab, 2008) วิธีนี้จึงนับเป็นวิธีการหนึ่งในการผลิตกล้าสักที่มีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชอย่างมีประสิทธิภาพส่วนหนึ่งเป็นผลจากการมีระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้ยืนต้นนั้นทำได้ยากกว่าไม้เนื้ออ่อน เช่นไม้ดอกหรือผัก เนื่องจากในไม้ยืนต้นเมื่อเกิดบาดแผลจะมีการสร้างสารประกอบกลุ่ม phenolic ซึ่งมีผลทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตช้า หรืออาจทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (regeneration) ทั้งนี้จึงต้องมีการพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างต่อเนื่องเพื่อลดปัญหาดังกล่าว และเพื่อให้ได้ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักมีการรายงานโดย Gupta *et al.* (1980) ที่ได้เพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นส่วนยอดของต้นกล้าที่มาจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ และชิ้นส่วนตาจากต้นแม่ที่มีลักษณะดี อายุกว่า 100 ปี เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (benzyl adenine, BA) และ kinetin เพื่อเพิ่มปริมาณยอดแล้วจึงชักนำให้เกิดรากในอาหารเหลวสูตร White (White, 1963) ที่เติมออกซิน 3 ชนิด คือ indole-3-acetic acid (IAA) indole-3-butyric acid (IBA) และ indole-3-propionic acid (IPA) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นจึงย้ายไปในอาหารสูตร White ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 3 – 4 สัปดาห์ พบว่ายอดที่ชักนำได้มีการสร้างรากได้ 80 เปอร์เซ็นต์

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต้นสักมีรายงานของ Widiyanto *et al.* (2005) ซึ่งได้ศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้อง (internode) ของสักโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร WPM ร่วมกับการเติม TDZ และ IBA หรือ NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ แคลลัสแบบแรกเป็นแคลลัสแบบเกาะแน่น (compact callus) เจริญเติบโตช้า มีสีเหลืองใส ถึงเขียวใส สามารถเจริญเป็นต้นได้ ส่วนแคลลัสอีกแบบมีลักษณะอ่อนนุ่ม แคลลัสเกาะกันหลวมๆ (friable callus) เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว พบว่าไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบเกาะแน่นได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ และ IBA

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิด somatic embryo ในสักเนื่องจาก somatic embryo สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้โดยไม่ผ่านการสร้างแคลลัสทำให้ลดความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้นได้ และ somatic embryo ยังพร้อมที่จะงอกเป็นต้นกล้าเมื่อย้ายไปเลี้ยงใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก Rijuta *et al*. (1996) ได้ชักนำให้เกิด somatic embryo จากตายอดและตาข้างของต้นสักอายุ 3 ปี พบว่าแคลลัสที่เกิดจากตายอดสามารถพัฒนาเป็น somatic embryo ในระยะ globular และระยะ heart shape ได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแคลลัสที่ชักนำได้จากตาข้างไม่สามารถพัฒนาได้ในอาหารสูตร MS แต่สามารถพัฒนาเป็น somatic embryo ได้ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2-isopentyl adenine (2iP) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้เทคนิคจัดวางบนกระดาษกรอง (filter paper bridges) พบว่าสามารถเจริญเป็น somatic embryo ได้โดยตรง ส่วน Yunaini and Widiyanto (2003) ได้ชักนำให้เกิด somatic embryo จากใบสัก พบว่าเกิด somatic embryo ในระยะ globular และระยะ heart shape เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร WPM (woody plant medium) ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.76 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นส่วนแสดงการตอบสนองดีขึ้นเมื่อเติม gibberellic acid (GA_3) ร่วมด้วย จากนั้น somatic embryo จะเจริญเข้าสู่ระยะตอร์ปิโด และสร้างใบเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ชิ้นส่วนข้อ และยอด นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีตาข้างที่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้โดยไม่ผ่านแคลลัส เมื่อได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้นให้มีการแตกตา หรือยอดแขนงเป็นจำนวนมาก เป็นการช่วยเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์ โดยเฉพาะในพืชที่เพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ยากเช่น ไม้ผล และไม้ป่ายืนต้น ดังเช่นรายงานของ Shirin *et al*. (2005) ซึ่งได้ชักนำยอดจากข้อสักบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.19 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำยอดได้สูงสุด จำนวน 8.33 ยอด จากนั้นชักนำให้เกิดรากในอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 2.79 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดรากสูงสุด 66.66 เปอร์เซ็นต์ มีรากเฉลี่ย 1.6 รากต่อต้น Tiwari *et al*. (2002) เพิ่มปริมาณยอดสักจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าต้นสักมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงขึ้นจากจำนวนยอดเฉลี่ย 1.46 ยอดเป็น 5.76 ยอด ส่วน Gyves *et al*. (2007) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นสักบนอาหารสูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถสร้างยอด และตั้งตัวได้ และสามารถชักนำรากได้โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ putriscine

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้น 160 มิลลิกรัมต่อลิตร Nor Aini *et al*. (2009) ได้ศึกษาการชักนำรากจากการเพาะเลี้ยงยอดสักในสภาพให้แสง และในสภาพมืด โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงในที่มืดบนอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดสามารถสร้างรากได้จำนวนมาก และมีความยาวมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารอื่นๆ ในสภาพมืด ส่วนการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสงนั้น พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างรากได้จำนวนมากที่สุด และอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรากยาวมากกว่าทุกทรีตเมนต์ที่ทดสอบ ส่วน Akram and Aftab (2008) ได้ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดจากการเพาะเลี้ยงข้อสัก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติม thidiazuron (TDZ) หรือ BA เพียงอย่างเดียว หรือการใช้ร่วมกับการเติม IBA ซึ่งพบว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 1.76 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 14.6 ยอด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน และต่อมา Akram and Aftab (2009) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนจากกิ่งชำ โดยเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม silver nitrate ($AgNO_3$) ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ เพื่อยับยั้งการสร้างเอทิลีน พบว่าสามารถชักนำการเกิดยอดได้สูงถึง 42.8 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 45 วัน จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นนอกจากเป็นผลมาจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมแล้ว ยังเป็นผลมาจากการเติม silver nitrate อีกด้วย เนื่องจาก silver nitrate มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีนและยับยั้งการผลิตเอทิลีน (Beyer, 1976) โดยเอทิลีนจะส่งเสริมการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างยอด (Strader *et al*., 2009) silver nitrate จะปลดปล่อยอนุภาค silver ion ไปจับกับ ethylene-binding site แทนที่ copper ion ทำให้เอทิลีนไม่สามารถทำงานได้ (Kumar *et al*., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า silver nitrate ส่งเสริมการเกิด somatic embryo การสร้างยอดและการเพิ่มปริมาณยอดให้กับพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อหลายชนิด เช่นใน *Cichorium* (Bais *et al*., 2000) และ *Sesamum indicum* (Seo *et al*., 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนเป็นเทคนิคหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการเพิ่มขึ้นมา โดยเป็นการถ่ายยีนที่สนใจ หรือยีนที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นยีนจากพืช อาจเป็นยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น การถ่ายยีนทำให้มีการสอดแทรกของยีนเข้าไปในจีโนมของพืช ซึ่งการสอดแทรกนี้ต้องมีความเสถียร โดยสามารถผ่านขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส และไมโอซีสได้ ซึ่งพืชที่ได้รับยีนเข้าไปเรียกว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) (สุรินทร์, 2548) ปัจจุบันมีการนำเทคนิคนี้ไปใช้กับพืชหลายชนิด โดยอาจแบ่งวิธีการถ่ายยีนได้ 2 ระบบ คือการถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) และการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

4.1 การถ่ายยีนโดยตรง

การถ่ายยีนโดยตรง เป็นการถ่ายยีนให้เซลล์พืชโดยส่งผ่านสารพันธุกรรมหรือการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง ไม่ต้องอาศัยพาหะ (vector) เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ เช่น การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) หรือสารเคมี เช่น สาร polyethylene glycol (PEG) และการถ่ายยีนโดยใช้ microinjection หรือการใช้สภาวะทางกายภาพต่างๆ เช่นการใช้วิธีการ ultrasonication เพื่อส่งเสริมให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เป้าหมายได้ ส่วนวิธีที่นิยมกันมาก ได้แก่ การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment, gene gun, microprojectile bombardment) โดยใช้แรงดันของก๊าซเป็นตัวผลักดันอนุภาคเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ทำให้เกิดการเชื่อมต่อระหว่างยีนที่ต้องการกับโครโมโซมของเซลล์เป้าหมาย การใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชสำคัญบางชนิดที่ไม่ตอบสนองต่อการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ดังนั้นจึงควรเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสมกับชนิดของพืช และเลือกใช้วิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงเหมาะสมกับการปฏิบัติงานและทรัพยากรที่มีอยู่ (อารีย์, 2541)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ

ส่วนอีกระบบหนึ่งคือการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (*Agrobacterium*-mediated gene transformation) ซึ่ง *Agrobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน จัดอยู่ใน Family Rhizobiaceae มี 2 ชนิดที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการถ่ายยีน คือ *A. tumefaciens* ซึ่งก่อให้เกิดโรค crown gall และ *A. rhizogenes* ซึ่งก่อให้เกิด hairy root โดยที่ภายในเซลล์ *Agrobacterium* มี extrachromosomal plasmid ขนาดใหญ่ประมาณ 200 กิโลคู่เบส โดยพบว่ามี Ti (turmor inducing) plasmid ใน *A. tumefaciens* และ Ri (root inducing) plasmid ใน *A. rhizogenes* (Tzfira and Citovsky, 2006)

A. tumefaciens ได้ถูกนำมาใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิดเนื่องจาก *A. tumefaciens* มีพลาสมิด Ti ซึ่งมี 2 ส่วนที่มีความสำคัญในกระบวนการถ่ายยีน คือส่วนของ T-DNA (transfer DNA) และ *vir* region (virulence region) ซึ่งพลาสมิด Ti ประกอบด้วย DNA ที่มีขนาดประมาณ 23 กิโลเบส ส่วนขอบเขตของ DNA กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) ประมาณ 25 เบส อยู่สองข้างของ T-DNA ซึ่งเรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) บน T-DNA มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารโอปีน ฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน เมื่อถูกถ่ายเข้าไป และแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมพืชจะส่งผลให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ผิดปกติเกิดเป็นลักษณะปุ่มปม (สุรินทร์, 2548) ดังนั้นการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายจึงเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติระหว่างเชื้อกับพืชอาศัย ส่วน *vir* region เป็นส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืชซึ่งมีขนาดประมาณ 35 – 40 กิโลเบส ซึ่งประกอบด้วยยีน 6 ตำแหน่งคือ *virA virB virC virD virG* และ *virE* ซึ่งในปัจจุบันพบว่าสามารถตัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออกแล้วใส่ยีนที่เป็นประโยชน์เข้าแทนที่ เมื่อพืชถูกบุกรุกด้วยเชื้อนี้ จึงทำให้ยีนที่เป็นประโยชน์ถูกถ่ายเข้าสู่พืชแทนที่ยีนที่ก่อให้เกิดโรค วิธีนี้จึงเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนให้กับพืชเนื่องจากสามารถถ่ายยีนให้กับหลายๆ ชิ้นส่วนของพืช ทำได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง

การส่งถ่าย T-DNA เข้าไปยังเซลล์พืช (ภาพที่ 1) เกิดขึ้นเมื่อพืชมีบาดแผลแล้วพืชจะมีการสังเคราะห์สารประกอบ phenolic หลายชนิด เช่น lignin และ flavonoid precursor โดยสารประกอบ phenolic เป็นสารสำคัญ ซึ่งเป็น signal molecule และสารอีกชนิดหนึ่งที่พบคือ acetosyringone (3,5 – dimethoxy – 4 – hydroxy acetophenone) โดยที่ acetosyringone จะกระตุ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ให้ *chvA chvB pscA* และ *att* บนโครโมโซมแบคทีเรียทำงาน โดยสร้าง filamemt มายึดเกาะกับผิวเซลล์พืช (Matthysse, 1986) ต่อมา acetosyringone จะกระตุ้นให้ *virA* ซึ่งเป็น transmembrane protein ในพืช ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ แล้วเกิดปฏิกิริยา autophosphorylation ทำให้มีการส่งสัญญาณต่อไปยัง *virG* ซึ่งเกาะอยู่กับโปรตีน *virA* ในสภาวะปกติจะอยู่ในรูปที่ไม่ active แต่เมื่อถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนเป็น *virG* ที่อยู่ในสภาวะ active ส่วนสาร acetosyringone และโปรตีนจาก *virG* ที่ active จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัส เปิดการแสดงออกของ *vir* genes อื่นๆ บน Ti-plasmid จากนั้นจะมีการสร้าง T-DNA complex เพื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช โดยโปรตีนจากยีน *virD1* และ *virD2* ซึ่งเป็นเอนไซม์ endonuclease ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ของ T-DNA ในบริเวณ LB และ RB โดยตัดสาย bottom strand (Wang *et al*., 1987) หลังจากตัดแล้วสาย T-DNA จะถูกจับโดยโปรตีนจากยีน *virD2* หนึ่งโมเลกุลที่ปลาย 5′ ทางด้าน RB แล้วเคลื่อนย้าย T-strand จาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช (Ward and Barnes, 1988)

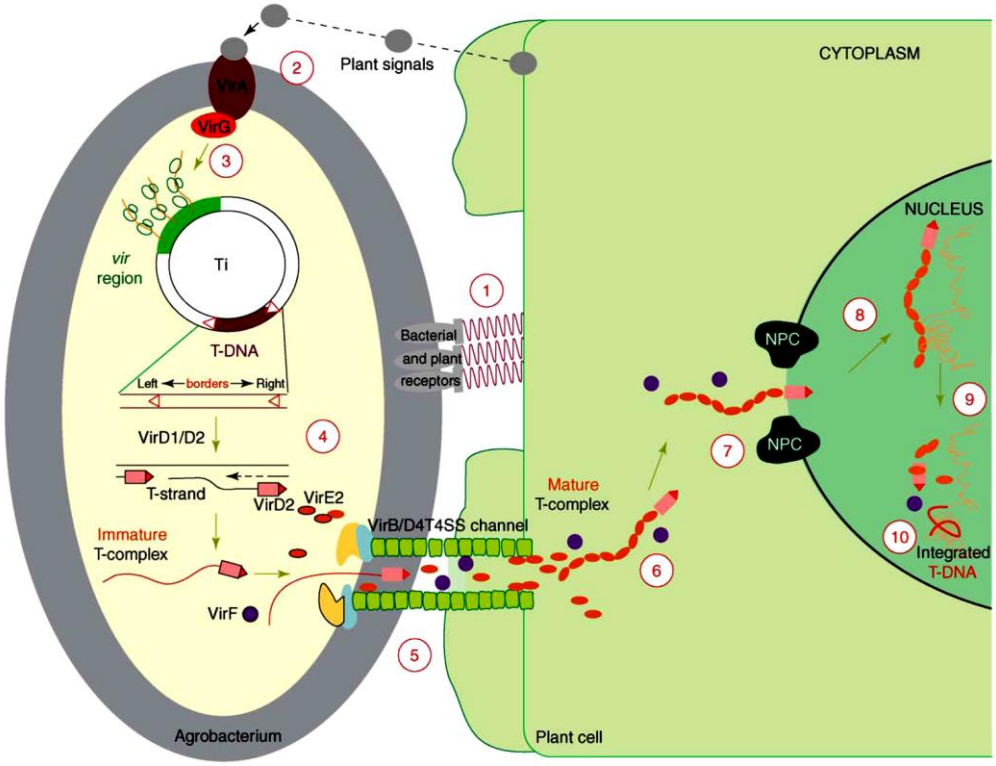
สายของ T-strand ที่มีโปรตีน *virD2* เกาะอยู่จะเคลื่อนออกจากเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืชโดยผ่านช่องเปิดที่สร้างขึ้นระหว่างผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเซลล์เมมเบรนของพืชโดยการทำงานร่วมกันของโปรตีน *virB* ต่อมาโปรตีน *virE2* จะเข้ามาจับสายของ T-strand ทางด้านปลาย 5′ ของ T- strand ตลอดความยาวเพื่อให้สายของ T-strand ไม่พับซ้อนกัน และเพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ในกลุ่ม exonuclease และ endonuclease มาย่อยสลาย T-strand ในระหว่างที่มีการเคลื่อนย้ายจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช และทำให้ T-strand อยู่ในรูปเส้นตรงเรียกโครงสร้างที่ประกอบด้วย T-DNA โปรตีน *virD2* และโปรตีน *virE2* นี้ว่า T-complex ซึ่งมีความยาวประมาณ 3,600 นาโนเมตร กว้างประมาณ 2 นาโนเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 50,000 กิโลดาลตัน (Citovsky *et al*., 1989) การเคลื่อนที่ของ T-complex เข้าสู่นิวเคลียสเป็นการเคลื่อนที่โดยใช้ microtubule โดยมีโปรตีน dynein motor เป็นตัวช่วย (Salman *et al*., 2005)

T- complex เคลื่อนย้ายจากไซโตพลาสซึมเข้าไปในนิวเคลียสของพืช ผ่านโปรตีนที่อยู่บริเวณช่องผ่านที่ผนังเซลล์ของนิวเคลียส (nuclear pore) โดยมีโปรตีนจากพืชมาจับกับ *virD2 virE2* และ *virE3* เพื่อช่วยขนส่ง T-DNA ผ่านช่องผ่านบริเวณผนังเซลล์ของนิวเคลียส จากนั้น T-DNA เคลื่อนที่เข้าไปบริเวณจีโนมของพืช แล้วกลุ่มโปรตีนที่ช่วยขนส่งจะแยกตัวออก โดย VIP1 ที่เกาะอยู่กับ *virE2* จะเข้าไปจับกับโปรตีนฮีสโตน H2A-1 จึงทำให้โปรตีนต่างๆ หลุดออกจากเส้นดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ T-DNA (Tzfira and Citovsky, 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนการแทรกตัวของ T-DNA เข้ารวมกับจีโนมของพืชนั้น ปัจจุบันความเข้าใจในกลไกนี้ยังไม่ชัดเจน มีหลายรายงานเสนอว่าอาจเกิดจากกระบวนการ illegitimate recombination (Gheysen *et al*., 1989; Lehman *et al*., 1994; Puchta, 1998) โดยเริ่มจากปลาย 3′ ของ T-DNA เข้าจับกับลำดับเบสคู่สม 2 – 3 เบส ของจีโนมพืช ทำให้เกิดช่องว่างที่ 3′ – 5′ strand จากนั้นเอนไซม์ endonuclease จะเข้าตัดบริเวณช่องว่างที่ปลาย 3′ ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ที่เกาะติดกับ *virD2* ที่ปลาย 5′ จะเป็นนิวคลีโอไทด์ลำดับแรกของ T-DNA ที่อยู่ใน 5′ – 3′ strand ของจีโนมพืช ส่วนของปลาย 3′ ที่ยื่นออกมาจะถูกตัดโดย endonucleases หรือ 3′ – 5′ exonucleases (de la Riva *et al*., 1998; Pitzschke and Hirt, 2010) นั่นคือรวมปลาย 5′ ของ T-DNA เข้ากับปลายด้าน 3′ ของพืช จากนั้นปลาย 3′ ของ T-DNA จึงเข้ารวมที่ด้าน 5′ ของพืช หลังจากมีการแทรกตัวเข้าไปของ T-DNA แล้วก็จะเกิดการเชื่อมช่องว่างด้วยกระบวนการซ่อมแซมโดยกลไกของพืช (Tinland *et al*., 1995) T-DNA ไม่มีตำแหน่งที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมพืชที่แน่นอน และพบการขาดหายไปของยีนบางส่วนในระหว่างการแทรกเข้าไปในจีโนมพืช (Ambros *et al*., 1986)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่พืช

1) แสดงการจับของ *Agrobacterium* กับ surface reception ของเซลล์พืช

2) การจดจำ plant signal molecules โดย *virA*/*virG* ของแบคทีเรีย

3) การกระตุ้น *vir* genes อื่นๆ ของแบคทีเรียให้ทำงาน

4) การตัด T- strand ออกให้เป็นสายเดี่ยว

5) การสร้าง T-complex และการขนส่งเข้าสู่เซลล์พืช

6) การเคลื่อนที่ของ T-complex ในไซโตพลาสซึม

7) การขนส่ง T-complex เข้าสู่นิวเคลียสของพืช

8) การเข้าคู่กันระหว่าง T-DNA กับจีโนมพืช

9) การแยกตัวของกลุ่มโปรตีนที่ช่วยในการขนส่ง T-DNA

10) การแทรกของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช

ที่มา: Tzfira and Citovsky (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

ความสำเร็จในการถ่ายยีนด้วยวิธีการนี้ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่นปัจจัยจากเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ พันธุ์พืช ชนิด และอายุของชิ้นส่วนพืช และการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนพืช ส่วนปัจจัยจากเชื้อ *A. tumefaciens* ได้แก่สายพันธุ์เชื้อ ความเข้มข้นของเชื้อ และขนาดของพลาสมิด ส่วนปัจจัยจากวิธีการถ่ายยีน ได้แก่ ความเข้มข้นสาร acetosyringone ที่ใช้ในการปลูกเชื้อและการเลี้ยงร่วม ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ และระยะเวลาในการเลี้ยงร่วม รวมไปถึงระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและระบบการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนที่เหมาะสมเป็นต้น

5.1 ปัจจัยจากเนื้อเยื่อพืช

เนื้อเยื่อของพืชที่มีแหล่งพันธุกรรมแตกต่างกัน ส่งผลให้มีอัตราการถ่ายยีนโดยเชื้อ *A. tumefaciens* ได้ต่างกัน เช่นการทดลองของ Widiyanto *et al.* (2009) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดต้นสักในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pBI121 เป็นพาหะ และมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ในสักที่แตกต่างกันจำนวน 7 สายต้น ได้แก่ ITB GT P97 P95 P75 P20 และ P108 จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว พบว่าสายต้น P108 มีอัตราการถ่ายยีนได้สูงกว่าสายต้นอื่นๆ ที่มาจากแหล่งเดียวกัน (P97 P95 P75 P20 และ P108) ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายต้นดังกล่าวโดยวิธี Random Amplified Polymorphism DNA markers (RAPD) พบว่าแต่ละสายต้นจัดอยู่ในกลุ่มพันธุกรรม (genetic cluster) ที่แตกต่างกัน แต่ละสายต้นจึงมีแตกต่างทางพันธุกรรมกัน (genetic variation) (Widiyanto *et al*., 1998) จึงเป็นไปได้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายต้นดังกล่าวมีผลต่อการตอบสนองต่อการทำงานของแบคทีเรีย ทำให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้แตกต่างกัน นั่นคือความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้นขึ้นกับความจำเพาะของเชื้อต่อพืชอาศัย ซึ่งสอดคล้องกับการถ่ายยีนใน perilla (*Perilla frutescens*) (Lee *et al*., 2005) และ aspen (Dai *et al*., 2003)

นอกจากนี้เทคนิคการทำให้เกิดบาดแผลที่บริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมายยังช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ เนื่องจากเมื่อพืชสร้างบาดแผลจะมีการสร้างสารประกอบ phenolic เพื่อส่งสัญญาณไปยังแบคทีเรียให้เกิดการถ่ายยีน และบาดแผลบริเวณชิ้นส่วนพืชเป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียบุกรุกเข้าไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมายได้ง่ายขึ้น วิธีการสร้างบาดแผลให้กับเนื้อเยื่อเพื่อการถ่ายยีนสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ การใช้มีดกรีด การใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความถี่สูง (sonicator) เพื่อทำให้เกิดบาดแผลขนาดเล็ก การใช้สารเคมี เช่น silicon carbide ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม และการใช้สุญญากาศ (vacuum) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีให้ขนาดของบาดแผลที่แตกต่างกัน เช่น การทำบาดแผลโดยใช้ใบมีดกรีด เนื้อเยื่อจะมีบาดแผลค่อนข้างใหญ่ นิยมใช้กับเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ เช่น บริเวณข้อหรือส่วนยอด โดยใช้ใบมีดผ่าตัดกรีดหลายๆ รอย หรือใช้การผ่าแบ่งชิ้นส่วน ก่อนการปลูกเชื้อ ส่วนการทำบาดแผลโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงนั้นเหมาะสำหรับเนื้อเยื่อขนาดเล็ก หรือยังไม่มีการกำหนดบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญอย่างแน่ชัด เช่น ใบเลี้ยง หรือเนื้อเยื่อที่มีซอกมุมมาก คลื่นเสียงความถี่สูงมีผลทำให้เนื้อเยื่อที่ผิวปริแตกเกิดเป็นแผลเล็กๆ จำนวนมากทั่วทั้งผิว ทำให้เชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ง่าย ระยะเวลาในการให้คลื่นเสียงแก่เนื้อเยื่อ และความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิด และขนาดของเนื้อเยื่อ เช่นรายงานของ Oliveira *et al.* (2008) ซึ่งได้ศึกษาการสร้างบาดแผลกับชิ้นส่วน epicotyl ของส้ม 3 วิธี คือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง และการใช้สุญญากาศ (vacuum infiltration) และการใช้ร่วมกัน 2 วิธี เปรียบเทียบกับการไม่สร้างบาดแผล พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสร้างบาดแผลนานขึ้น เนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาที่ลดลง และเมื่อทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว พบว่าการสร้างบาดแผลโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ แต่หากใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกันจะช่วยส่งเสริมให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เนื่องจากการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นการสร้างบาดแผลขนาดเล็กจึงอาจเป็นช่องทางที่เชื้อสามารถบุกรุกได้ดีขึ้น อีกทั้งการสร้างบาดแผลจะทำให้พืชมีการสร้างสารประกอบ phenolic ขึ้น เป็นการส่งเสริมการถ่ายชิ้นส่วน T-DNA เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช ส่วนการใช้สุญญากาศหลังการสร้างบาดแผลโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงนั้นเป็นการช่วยให้เซลล์เชื้อบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ลึกกว่าการวางเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) เพียงอย่างเดียว ดังนั้นในการถ่ายยีนให้มีประสิทธิภาพสูงจึงต้องศึกษาระบบการสร้างบาดแผลที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืช

5.2 ปัจจัยจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

การเลือกสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* เป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่างๆ ถึงแม้ *A. tumefaciens* จะสามารถบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงคู่ได้ก็ตามแต่ก็มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดพืชด้วยเช่นกัน เช่นรายงานของ Widiyanto *et al.* (2004) ได้ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสักโดยเปรียบเทียบ *Agrobacterium* 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ GV3101 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pCAMBIA1303 ตามลำดับ โดยมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล หลังการเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว พบว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนมีตั้งแต่ 5 – 80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับชิ้นส่วนของพืช พันธุกรรมของพืช และสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยที่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงในทุกๆ สายต้นของต้นสักที่ทดสอบ นอกจากสายพันธุ์ของเชื้อแล้ว ความเข้มข้นของเชื้อและขนาดของพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีนนั้น ต้องมีความเหมาะสมกับพันธุ์ และชนิดของเนื้อเยื่อพืชเป้าหมายอีกด้วย

5.3 ปัจจัยจากวิธีการถ่ายยีน

สภาพการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation conditions) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์พืชให้เป็นเซลล์ที่พร้อมจะถ่ายยีน ทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพ และยังเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่ในพืชต้นเดียวกัน เมื่อนำมาถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* อาจต้องการระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียต่างกัน โดยทั่วไปแล้วจะใช้เวลาประมาณ 2 – 3 วัน การ co-cultivation ที่ระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น แต่หากนานเกินไป จะส่งผลต่อการเพิ่มประมาณของเชื้อแบคทีเรียทำให้กำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อพืชได้ยาก อาจส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ และยังลดประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนอีกด้วย (Cervera *et al*., 1998; Custis *et al*., 1999) อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อพืช เช่นการถ่ายยีนไปยังปลายยอดองุ่น พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมของเชื้อกับชิ้นส่วน เป็นระยะเวลา 4 วัน มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้สูง (Dutt *et al*., 2007) ส่วนในแคลลัสส้มใช้ระยะเวลา 5 วัน (Song *et al*., 2007) เป็นต้น นอกจากนี้การปลูกเชื้อ (inoculation) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ช่วยทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* ยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืชได้ยังมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนอีกด้วย โดยหากใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานเกินไปจะส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดต้นของพืชลดลง (Yong *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้การเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนยังสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเติมสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรีย เช่น silver nitrate การพัฒนาเทคนิคในการปลูกเชื้อ และ co-cultivation และการกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินด้วยวิธีที่เหมาะสม (Zhao *et al*., 2000; 2001)

6. ยีนรายงานผล (reporter gene)

การถ่ายยีนเป้าหมายไปยังเซลล์พืชนั้นมีการใช้ยีนรายงานผลส่งถ่ายไปพร้อมกับยีนที่สนใจเพื่อการประเมินประสิทธิภาพในการถ่ายยีน ยีนรายงานผลเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการเพื่อตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์ว่ามีการแสดงออกที่ตำแหน่งใดบนเนื้อเยื่อ และการแสดงออกมีมากน้อยเพียงใด โดยที่ยีนรายงานผลจะควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่มีการแสดงออก และสามารถตรวจสอบการแสดงออกได้โดยตรงบนเนื้อเยื่อเป้าหมาย (Christou *et al*., 1988) ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ได้แก่ยีน *gusA* (*uidA*) ที่เป็นยีนสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronide cyclohexylammonium salt (X-Gluc) จะได้ตะกอนสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อที่มียีนนี้ วิธีนี้สามารถตรวจสอบได้ง่าย มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม นอกจากนี้มีการใช้ยีน *firefly luciferase* (*Luc*) ที่ได้จากหิ่งห้อย สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนจากการเรืองแสงเมื่อทำปฏิกิริยากับสารเคมีจำเพาะ ยีน *green fluorescent protein* (*gft*) ที่มาจากแมงกะพรุน ทำให้ในเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนมีการเรืองแสงภายใต้แสง UV หรือแสงสีฟ้า (blue light) ไม่สร้างความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเป้าหมาย ซึ่งยีนนี้ถูกนำมาใช้เป็นยีนรายงานผลในกระบวนการถ่ายยีนทั้งในพืชและในสัตว์ (Chalfie *et al*., 1994)

7. ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene)

การถ่ายยีนเครื่องหมายคัดเลือกไปพร้อมกับยีนเป้าหมายนั้น เพื่อใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน และประเมินประสิทธิภาพของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกจะเป็นยีนควบคุมลักษณะบางประการที่สามารถใช้ในการคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1 ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

ยีนเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการคัดเลือกเช่นยีนที่แสดงลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ได้แก่ยีน *neomycin phosphotransferase II* (*npt II*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin โดยเมื่อถ่ายยีนเครื่องหมายคัดเลือกเข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนที่ต้องการ โดยเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับยีนข้างต้นจะตายในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ พืชปกติเมื่อได้รับสารปฏิชีวนะ สารจะเคลื่อนย้ายไปยังเซลล์โดยผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ แล้วเข้าจับกับไรโบโซม ส่งผลให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิด (Hansen and Wright, 1999) ทำให้ชิ้นส่วนพืชแสดงอาการ chlorosis และใบซีดขาว ส่วนเซลล์ที่ได้รับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานจะยังคงรอดชีวิตอยู่ได้ ทำให้สามารถแยกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ Norwati *et al*. (2007) รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่ข้อสักโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค มียีน *hpt* เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก พบว่าการเติม hygromycin ในอาหารคัดเลือกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ ส่วน Widiyanto *et al*. (2009) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ยอดสักโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ พบว่าการเติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารคัดเลือก สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีน *nptII* ได้ เป็นต้น ซึ่งความต้านทานสารปฏิชีวนะของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ชนิดของชิ้นส่วน ระยะการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการถ่ายยีนจึงมีความจำเป็นที่ต้องทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์พืชหลังจากการถ่ายยีน เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการกำจัดเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

7.2 ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช

นอกจากการใช้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะยังมีการนำยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกอีกด้วย การคัดเลือกโดยใช้สารกำจัดวัชพืชจะคล้ายกับการใช้สารปฏิชีวนะ โดยสารเหล่านี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ได้รับยีน เช่นยีน *bar* จากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* และยีน *pat* จากเชื้อ *S. viridochromogenes* ซึ่งต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinothricin ได้แก่ Basta™ Ignite™ และ Liberty™ สารในกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) โดยเอนไซม์ GS ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ glutamine โดยเติมโมเลกุลของแอมโมเนียเข้าจับกับ glutamate เมื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

phosphinothricin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS จะทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียภายในเซลล์ เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ ทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ยีน *bar* และยีน *pat* จะควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา acetylation ทำให้ phosphinothricin ไม่สามารถไปจับกับเอนไซม์ GS ได้ (Jansen, 2000) และยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชอีกกลุ่มที่มีการใช้อย่างแพร่หลายคือยีนต้านทานต่อไกลโฟเสท (glyphosate) ได้แก่ยีน *aroA* จากเชื้อ *Salmonella typhimurium* (Comai *et al*., 1983) ยีน *EPSPs* จากเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ CP4 และยีน *goxv247* จากเชื้อ *Ochrobactrum anthropi* สายพันธุ์ LBAA โดยที่ไกลโฟเสทเป็นสารกำจัดวัชพืชจัดอยู่ในกลุ่มฟอสฟอเนต (phosphonate) ใช้แบบหลังวัชพืชงอก และไม่เลือกทำลาย สามารถทำลายพืชที่มีสีเขียวได้ทุกชนิด (รังสิต, 2531) และสามารถย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ ไกลโฟเสทจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphase synthase (EPSPs) ในกระบวนการ shikimate pathway ซึ่ง EPSPs เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างกรดอะมีโนกลุ่มอะโรมาติก (aromatic amino acid) และสาร second metabolites อีกหลายๆ ชนิด ซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับการเจริญเติบโต และการมีชีวิตอยู่รอดของพืช จึงทำให้พืชนั้นตาย (Nafziger *et al*., 1984; Wells and Appleby, 1992)

นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า การใช้สารไกลโฟเสทเป็นสารคัดเลือกหลังการถ่ายยีนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ดี และเกิดการ escapes ได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีน *bar* และยีน *nptII* เป็นสารคัดเลือก เนื่องจากกลไกภายในเซลล์พืชมีการลดความเป็นพิษของสารคัดเลือกดังกล่าว โดยเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะสร้างสารบางอย่างออกมา ทำให้ประสิทธิภาพของสารคัดเลือกลดลง เกิดบริเวณที่เป็น cross – protection ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ แต่การใช้ยีน *EPSPs* เป็นยีนคัดเลือกนั้น พบว่ายีน *EPSPs* ไม่ถูกทำลายในเซลล์พืช และไม่มีการสร้างสารส่งไปยังเซลล์ปกติทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Akbarzadeh *et al.,* 2010)

8. สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

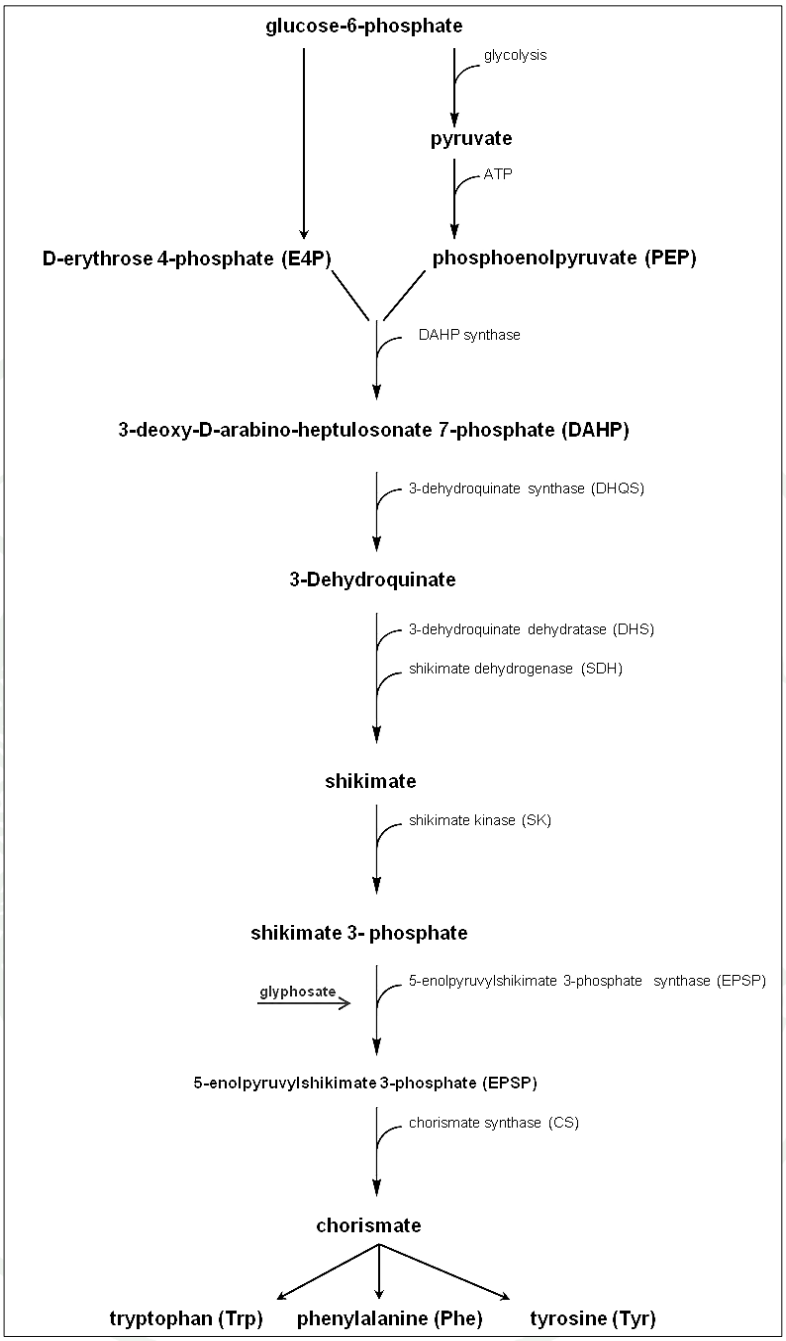
สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทมีชื่อทางเคมีคือ N–phosphonomethyl glycine ชื่อทางการค้าคือ Roundup Touchdown และ Spark ฯลฯ เป็นต้น จัดเป็นสารประเภทไม่เลือกทำลาย มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้ถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส แต่จะทำหน้าที่ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ยีสต์ รา และพืช ไม่พบในมนุษย์และสัตว์ (Kishore and Shah, 1998) ไกลโฟเสทมีการเคลื่อนย้ายภายในดินได้ค่อนข้างต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากมีการยึดเกาะกับอนุภาคดินได้สูง จึงทำให้มีการเคลื่อนย้ายของสารไปยังแหล่งน้ำใต้ดินได้น้อย อีกทั้งยังมีความคงทนอยู่ในดินได้ต่ำ ย่อยสลายได้ง่ายโดยมีค่า half-life เป็นระยะเวลา 47 วัน และจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้และเปลี่ยนสารเป็น phosphoric acid แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Franz *et al*., 1997) จึงทำให้ไกลโฟเสทมีความปลอดภัยสูง มีการนำไปใช้อย่างใช้กว้างขวาง

EPSPs เป็นเอนไซม์ที่ทำให้ phosphoenol pyruvate (PEP) และ shikimate-3 phosphate เปลี่ยนไปเป็น 5-enolpyruvoyishikimate-3-phosphate (EPSP) จากนั้น EPSP จะเกิดการกำจัดหมู่ฟอสเฟต และเกิดการสร้างพันธะได้เป็น chorismate ซึ่งเป็นสารสุดท้ายในกระบวนการ shikimate pathway (ภาพที่ 2) chorismate เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก ได้แก่ quinones tryptophan tyrosine และ phenylalanine (Gorlach *et al*., 1993) ซึ่ง phenylalanine นั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร second metabolites หลายชนิด ได้แก่ lignins phytoalexins pigment UV light protectants และ antioxidants (Dixon and Paiva, 1995) tyrosine เป็นสารตั้งต้นของ tocopherol และ tocotrienols หรือวิตามินอี (Rippert *et al*., 2004) ส่วน tryptophan เป็นสารตั้งต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช indole-3 acetic acid (IAA) (Wakasa *et al*., 2006) ดังนั้น EPSPs จึงเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ shikimate pathway ในการสร้างสารต่างๆ ที่มีความจำเป็นต่อการมีชีวิตของพืช

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์สารจาก shikimate pathway

ที่มา: Azania *et al.* (2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชผ่านทาง cuticle แล้วจะเคลื่อนย้ายจากบริเวณใบไปยังใบอ่อน บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ และเนื้อเยื่อสะสมอาหาร โดยสารไกลโฟเสทเข้ายับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ EPSPs มีผลทำให้เกิดการสะสมของสาร shikimic acid และเอนไซม์ต่างๆ ใน shikimate pathway เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในต้นพืช ในการสร้างกรดอะมิโนและสารทุติยภูมิต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืชลดลง หลังพืชได้รับสารเป็นระยะเวลา 4 – 7 วัน สารมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชทันที โดยพืชจะแสดงอาการ chlorosis และ necrosis ในวัชพืชวงศ์หญ้าจะแสดงอาการ chlorosis ก่อน ทำให้ใบที่ยังไม่เจริญเต็มที่ และจุดเจริญถูกทำลายไป (ทศพล, 2545)

9. พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อไกลโฟเสทโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น การทำให้พืชสร้างเอนไซม์ EPSPs ในปริมาณมาก (over production) การถ่ายยีนที่สร้างเอนไซม์ในรูปที่ไม่ไว (insensitive form) ต่อไกลโฟเสท และการลดความเป็นพิษ (detoxification) ของไกลโฟเสท

การทำให้พืชสร้างเอนไซม์ EPSPs ในปริมาณที่มาก ทำให้พืชมีเอนไซม์เพียงพอที่จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งสามารถทำได้โดยการคัดเลือกในสภาพแปลงทดลอง หรือในสภาพโรงเรือน โดยหลังจากที่ให้สารไกลโฟเสทแล้วคัดเลือกต้นที่ไม่ถูกทำลาย และสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้มาเพาะเลี้ยง ส่วนการคัดเลือกในระดับเซลล์จะใช้เทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย โดยใส่สารกำจัดวัชพืชลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ ค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้น แล้วคัดเลือกเซลล์ที่สามารถรอดชีวิต เซลล์ของพืชที่อ่อนแอต่อสารสามารถกลายพันธุ์ได้ เมื่อเลี้ยงเซลล์นั้นในอาหารมีสารดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่เกิดขึ้นมาใหม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม จึงทำให้มีความแตกต่างในด้านความต้านทานต่อสาร และสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวได้ เมื่อได้เซลล์ที่ทนทานและต้านทานแล้วก็นำเซลล์เหล่านี้มาพัฒนา (regenerate) ให้เป็นต้นพืชต่อไป (ศรีสม, 2535) นอกจากนี้ยังมีการใช้การถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ EPSPs เช่น ในพิทูเนียได้มีการถ่ายยีน *EPSPs* โดยใช้ 35S โปรโมเตอร์ ซึ่งเป็น strong promoter พบว่ามีระดับการสร้างเอนไซม์ EPSPs ในระดับสูง พิทูเนียแสดงลักษณะต้านทานไกลโฟเสทได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับยีน (Shah *et al*., 1986) ส่วนการถ่ายยีนที่สร้างเอนไซม์ในรูปที่ไม่ไว (insensitive form) ต่อไกลโฟเสทนั้น ทำได้โดยการถ่ายยีนที่ทำให้พืชสร้างเอนไซม์ต่างจากปกติ (mutant enzyme)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จึงไม่ไวต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ในการศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ EPSPs ในแบคทีเรียนั้นพบว่ามีบางส่วนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสไป ทำให้ไกลโฟเสทไม่สามารถเข้าจับได้ ส่งผลให้สามารถต้านทานต่อไกลโฟเสท (Stalker *et al*., 1988) ตัวอย่างยีนที่มีการนำมาใช้ ได้แก่ ยีน *aroA* ซึ่งพบในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* หรือจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่กลายพันธุ์ (Comai *et al*., 1983) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 101 จากโพรลีนเป็นซีรีน ยีน *aroA* จะถอดรหัสเป็นเอนไซม์ EPSPs และช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน phosphoenolpyruvate (PEP) และ shikimate-3 phosphate ไปเป็น EPSP ทำให้พืชมีการสร้างเอนไซม์ EPSPs ที่มากเพียงพอที่จะแสดงลักษณะต้านทานต่อไกลโฟเสทได้ ส่วนยีน *CP4-EPSPS* แยกได้จากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ CP4 โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน 1 ตำแหน่งจาก C เป็น G ทำให้กรดอะมิโนที่ได้เปลี่ยนแปลงไปจาก Glycine (Gly) เป็น Alanine (Ala) ทำให้ไกลโฟเสทไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์นี้ได้ เอนไซม์จึงสามารถสร้างกรดอะมิโนได้ตามปกติ พืชสามารถเจริญเติบโตได้ (Funke *et al*., 2006)

นอกจากนี้การลดความเป็นพิษของไกลโฟเสทยังได้ถูกนำมาใช้ในการสร้างพืชต้านทานต่อไกลโฟเสท โดยการถ่ายยีนที่ควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของไกลโฟเสท จึงทำให้สามารถลดการสะสมของไกลโฟเสทในเนื้อเยื่อพืชได้ โดยเฉพาะในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (Pline-Srnic, 2006) ยีนในกลุ่มนี้ได้แก่ยีน *gat* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ glyphosate N-acetyltransferase ในการ acetylates และยับยั้งการทำงานของไกลโฟเสท (deactivate glyphosate) (Castle *et al*., 2004) ส่วนยีน *gox* จากเชื้อ *Ochrobactrum anthropi* จะสร้างเอนไซม์ glyphosate oxidoreductase ซึ่งจะไปย่อยสลายพันธะไนโตรเจนและคาร์บอนของสารไกลโฟเสท ทำให้ไกลโฟเสทเปลี่ยนเป็น glyoxylate และ aminomethylphosphonic acid ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ ดังนั้นจึงได้มีการถ่ายยีน *gox* เพื่อลดความเป็นพิษของไกลโฟเสท ทำให้พืชแสดงความต้านทานต่อไกลโฟเสทได้

ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชนี้นิยมใช้ในพันธุวิศวกรรมทางพืชเพื่อที่จะนำมาใช้ควบคุมวัชพืช โดยพบว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทนี้มีมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมคิดเป็นพื้นที่ 120 ล้านเฮกตาร์ทั่วโลก (Duke and Powles, 2009) โดยพืชที่ประสบความสำเร็จ และมีการปลูกเป็นการค้าแล้ว ได้แก่ ถั่วเหลือง (Roundup Ready® soybeans) ฝ้าย (Genuity® Roundup Ready® Flex cotton) ข้าวโพด (Roundup Ready® Corn) คาโนล่า (Roundup Ready® canola) ถั่วอัลฟาฟ่า (Genuity® Roundup Ready® Alfalfa) และ sugarbeet (Genuity® Roundup Ready® sugarbeets) นอกจากนี้ยีนต้านทาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อสารกำจัดวัชพืชยังสามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกเซลล์แทนการใช้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ หรือนำมาเป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนอีกด้วย

10. การถ่ายยีนในต้นสัก

เทคนิคการถ่ายยีนถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด ส่วนในไม้ยืนต้นนั้นยังพบได้น้อยแต่มีรายงานบ้างเช่นใน ต้นจันทน์ (Lakhsmi-Sita *et al*., 1998) ยางพารา (Montoro *et al*., 2000) สน (Cerda *et al.,* 2002) และ Himalayan poplar (Thakur *et al*., 2005) เป็นต้น

การถ่ายยีนในสักมีรายงานการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic) ในการถ่ายยีน *uidA* และยีน *cry1Ab* เข้าสู่ข้อสัก โดยในการถ่ายยีน *uidA* ใช้พลาสมิด pCAMSB1 ที่มียีน *uidA* และยีน *hpt* เคลือบบนอนุภาคทองขนาด 1.6 ไมครอน ยิงอนุภาคด้วยแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างระหว่างเนื้อเยื่อกับแท่นยิงเป็นระยะ 6 เซนติเมตร พบว่ามีต้นสักเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ที่มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือก และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนพบว่ามีต้นสัก 59 เปอร์เซ็นต์ของต้นที่รอดชีวิตที่สามารถสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase ได้ (Norwati *et al*., 2007) ส่วนการถ่ายยีน *cry1Ab* เข้าสู่ข้อสัก โดยใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีน *gus* ยีน *hpt* และยีน *cry1Ab* เคลือบบนอนุภาคทองขนาด 1.6 ไมครอน ยิงอนุภาคด้วยแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ระยะห่างระหว่างเนื้อเยื่อกับแท่นยิงเป็นระยะ 6 เซนติเมตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 6 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของต้นสักในการคัดเลือกรอบแรกมีสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการเปลี่ยนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 นั้น พบว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นสักลดลงเหลือเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *cry1Ab* ในต้นสักที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกด้วยวิธี PCR พบว่ามียีน *cry1Ab* อยู่ 64 เปอร์เซ็นต์ (Norwati *et al*., 2003) นำต้นที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้วิธี RT-PCR และตรวจสอบด้วยวิธี insect bioassay พบว่าหนอนกินผิวใบสัก (*Paliga damastesalis*) มีอัตราการตาย 73 – 80 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงโดยใช้ใบของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน *cry1Ab* เป็นอาหาร ในขณะเดียวกันหนอนที่ทดสอบยังมีขนาดเล็กกว่าหนอนในสภาพปกติ และพื้นที่ในการเข้าทำลายของหนอนในต้นที่ได้รับการถ่ายยีนยังมีน้อยกว่าต้นปกติอีกด้วย (Norwati *et al*., 2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนการใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้น Widiyanto *et al.* (2009) ได้ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 เพื่อถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ส่วนยอดของต้นสักในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้วิธี vacuum-infiltrated เพื่อให้เชื้อแทรกซึมเข้าสู่เซลล์พืชที่ระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่า vacuum-infiltrated เป็นเวลา 5 นาที พืชสามารถฟื้นตัวได้ดี จากนั้นเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน จึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว พบว่าต้นสักที่มาจากสายต้นต่างๆ กันนั้นมีการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ GUS ที่แตกต่างกัน โดยสายต้นที่ให้เปอร์เซ็นต์ยอดที่ติดสีน้ำเงินมากสุดเป็น 94.6 เปอร์เซ็นต์ แต่การแสดงออกส่วนใหญ่พบบริเวณใบและปล้อง ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ และปลายยอดยังพบได้น้อย ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นสักอย่างมีประสิทธิภาพจึงยังคงมีการศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการถ่ายยีนที่มีคุณค่าอื่นๆ ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษานี้ใช้ต้นสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จำนวน 3 สายต้น คือ 22C53 26C33 และ 16C7 ซึ่งทั้งสามสายต้นมาจากแม่ไม้ที่มีลักษณะดี (ได้รับความอนุเคราะห์จากองค์การอุตสาหกรรมป่าไม้, ออป.) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การถ่ายยีน และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
2.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
2.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave machine)
2.1.4 ตู้อบ (hot air oven)
2.1.5 ตู้อบไมโครเวฟ
2.1.6 เครื่องกวนสารอัตโนมัติ และแท่งแม่เหล็ก
2.1.7 ชั้นวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมระบบให้แสง
2.1.8 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อพืช
2.1.9 ปากคีบ ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด
2.1.10 เครื่องแก้ว ประกอบด้วย ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ ฟลาสก์ จานเพาะเลี้ยง และขวดเพาะเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 วัสดุและอุปกรณ์ในการถ่ายยีน

2.2.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

2.2.2 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

2.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)

2.2.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2.2.5 เครื่องผสมสาร (vortex)

2.2.6 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator : Transsonic T460/H, 35 kHz, Elma Hans Schmidbauer, Germany)

2.3 วัสดุและอุปกรณ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

2.3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

2.3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

2.3.3 เครื่อง thermal cycler และชุดอุปกรณ์ในการทำ PCR และ electrophoresis

2.3.4 เครื่อง gel documentation system พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพเจล

2.3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Southern blot hybridization

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) Woody Plant Medium (WPM) และ Schenk and Hildebrandt (SH) (ตารางผนวกที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เช่น 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) α-naphthaleneacetic acid (NAA) indole-3-butyric acid (IBA) และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโต-ไคนิน เช่น thidiazuron (TDZ) และ 6-benzyladenine (BA)

3.1.3 สารที่ใช้สำหรับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ hydrochloric acid (HCl) และ sodium hydroxide (NaOH)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายยีน

3.2.1 สาร acetosyringone

3.2.2 สารปฏิชีวนะ ประกอบด้วย hygromycin B cefotaxime และ kanamycin

3.2.3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตร LB (Luria-Bertani media) (ตารางผนวกที่ 2)

3.3 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA จากพืช

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ประกอบด้วย สารละลาย 10 mM dNTP mix สารละลายแมกนีเซียม (25 mM $MgCl_2$) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase พร้อม buffer

3.3.4 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนรายงานผล *β-glucuronidase* (*gus*) (รักชนก, 2549)

GUS456 (forward): 5′-AAACGGCAAGAAAAAGCAGTC-3′
GUS1375 (reverse): 5′-CAGGCACAGCACATCAAAGAG-3′

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

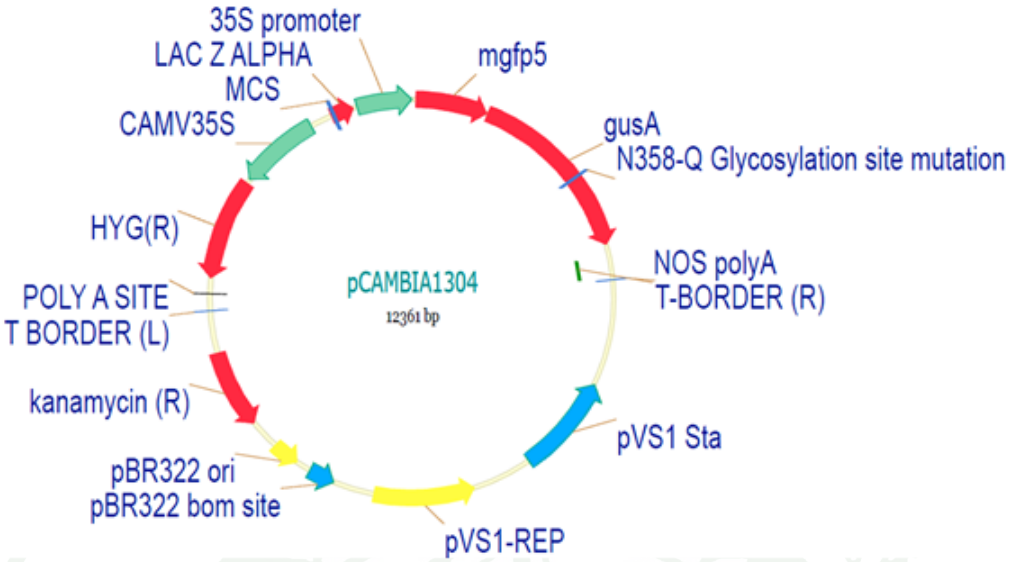
3.3.5 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุบิน หินจันทร์)

EPSPs-F (forward): 5′-CCATTCCGCTCGAGATGGCACAAATTAA CAACATGGC-3′
EPSPs-Rv (reverse): 5′-ATCCACCGCTCGAGCGGTCATCAGGCAG CCTTCGTAT-3′

4. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* และพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

เชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการทดลองได้แก่สายพันธุ์ EHA 105 และ AGL 1 ทั้งสองสายพันธุ์บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 1304 มีขนาด 12,361 คู่เบส โดยในส่วนของ T-DNA ประกอบด้วยยีน *green fluorescent protein* (*mgfp5*) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับยีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin สำหรับใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนทั้งสองส่วนนี้มีโปรโมเตอร์ *CaMV35S* เป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน และเทอร์มิเนเตอร์ คือ *NOS* เป็นส่วนควบคุมการหยุดการแสดงออกของยีน และภายในพลาสมิดมียีน *neomycin phosphotransferase* (*nptII*) เป็นยีนควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin สำหรับใช้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิด (ภาพที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 แผนที่โครงสร้างและขนาดพลาสมิด pCAMBIA1304

ที่มา: CAMBIA, GPO Box3200, Canberra ACT 2601, Australia

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก

1.1 ศึกษาผลของสายต้น ชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารต่อการเกิดแคลลัส

นำฐานใบ และข้อ จากต้นสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 2 เดือน บนอาหารสูตร MS (ภาพที่ 4) จำนวน 3 สายต้น คือ 22C53 26C33 และ 16C7 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร คือ ½ MS MS WPM และ SH โดยทุกสูตรอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยจัดสิ่งทดลองแบบ factorial จำนวน 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ภาพที่ 4 ต้นสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS อายุ 2 เดือน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัส

เพาะเลี้ยงฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ซึ่งเป็นสูตรที่สามารถชักนำแคลลัสได้ดีจากการทดลองที่ 1.1 และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 1 วัน แล้วย้ายไปในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี DMRT

1.3 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

นำชิ้นส่วนข้อของสักสายต้น 22C53 ในสภาพปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 4.0 หรือ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาผลของการเติม silver nitrate ความเข้มข้น 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 10 20 30 40 หรือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลภายหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนยอด และความยาวยอด วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 5 ชิ้น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 การชักนำให้ต้นอ่อนออกราก

นำยอดสักที่ชักนำได้จากการทดลองที่ 1.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS หรือ MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนราก เปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำทรีตเมนต์ละ 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 5 ยอด เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 2 การทดสอบสารปฏิชีวนะ และสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่สัก

2.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B และสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (glyphosate) ที่เหมาะสมในการกำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

นำชิ้นส่วนฐานใบ ยอด และข้อสักสายต้น 22C53 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 2 เดือนมาใช้ทดสอบเพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการถ่ายยีน โดยเพาะเลี้ยงฐานใบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดและข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละสูตรอาหารเติม hygromycin B (PAA, Australia) ความเข้มข้น 0 3.0 5.0 10 หรือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือไกลโฟเสทความเข้มข้น 0 169 507 845 หรือ 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มืด 1 วัน แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ บันทึกผลการตายของชิ้นส่วน เพื่อเลือกความเข้มข้นของ hygromycin B และไกลโฟเสท ที่น้อยที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนของสักตายทั้งหมด เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นสำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

ตัดชิ้นส่วนยอด ข้อ และฐานใบของสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาปลูกเชื้อโดยวิธีการแช่ชิ้นส่วนในเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (OD_{600}=1) ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก ปลูกเชื้อในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วย้ายชิ้นส่วนมาวางบนกระดาษซับที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับเชื้อออก จากนั้นย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงร่วม (co-cultivation) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายฐานใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแต่ละสูตรอาหารเติม cefotaxime ความเข้มข้น 0 200 250 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ เพื่อเลือกความเข้มข้นของ cefotaxime ที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วนพืชได้หมด

2.3 ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อสัก

เพาะเลี้ยงฐานใบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแต่ละสูตรอาหารเติม cefotaxime ความเข้มข้น 0 200 250 300 350 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มืด 1 วัน แล้วย้ายไปวางเลี้ยงในที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดยอด และชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส เพื่อเลือกความเข้มข้นของ cefotaxime ที่มากที่สุดที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนสัก เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการตัดสินใจเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ออกจากชิ้นส่วนพืชภายหลังการถ่ายยีน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 3 ศึกษาวิธีการถ่ายยีนที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อสัก โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

3.1 การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304

3.1.1 การสกัดพลาสมิด pCAMBIA 1304 จากเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit (OMEGA Bio-tek Inc., USA)

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในที่มืด เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที รินส่วนใสออกแล้วกวนตะกอนเซลล์ใน Solution I/RNase A solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร โดย vortex ให้เข้ากัน ย้ายเซลล์แขวนลอยใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม Solution II ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา เติม Solution III ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เกิดตะกอนเซลล์สีขาว แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนใสไปใน HiBind DNA Mini Column ที่เตรียมแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ทิ้ง แล้วเติม Buffer HB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ทิ้ง จากนั้นเติม DNA Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้สองครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยง Column อีกครั้งเพื่อกำจัดสารละลายส่วนเกินที่ค้างใน Column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้าย Column ไปประกอบกับหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ แช่ไว้ประมาณ 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยใช้เครื่อง gel document เก็บพลาสมิดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในโอกาสต่อไป

3.1.2 การถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1304 เข้าไปยังเซลล์ของ *Agrobacterium tumefaciens* โดยวิธี Freeze/Thaw (Wise *et al*., 2006)

3.1.2.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 – 16 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารทิ้งและละลายตะกอนเซลล์เบาๆ ใน $CaCl_2$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์เบาๆ ใน $CaCl_2$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.2.2 การนำพลาสมิด pCAMBIA 1304 เข้าสู่ competent cell

นำ competent cell ของ *A. tumefaciens* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส วางบนน้ำแข็งให้ละลาย เติมพลาสมิด pCAMBIA 1304 ปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม แล้วนำไปจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว 5 นาที วางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง 5 – 10 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 4 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 100 – 300 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบหาพลาสมิด pCAMBIA 1304

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยใช้เทคนิค PCR และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดไว้ใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน

การทดลองนี้เป็นการทดสอบหาปัจจัยที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสักในสภาพเพาะเลี้ยง โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน และประเมินผลโดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *β-glucuronidase* (*gus*) ซึ่งเป็นยีนรายงานผล (reporter gene) ด้วยวิธี histochemical assay ปัจจัยการถ่ายยีนที่ทดสอบประกอบด้วย 6 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ศึกษาชิ้นส่วนของต้นสักที่ใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ชิ้นส่วนข้อ และฐานใบ

ปัจจัยที่ 2 ศึกษาวิธีการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนของสัก โดยการใช้เข็มแทงเนื้อเยื่อ การใช้ใบมีดกรีดบริเวณผิวเนื้อเยื่อ และการสร้างบาดแผลโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication)

ปัจจัยที่ 3 ศึกษาผลของการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 และ AGL 1 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน

ปัจจัยที่ 4 ศึกษาความเข้มข้นของ *A. tumefaciens* ที่ 2 ระดับ คือ เซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีค่า OD_{600}=1.0 และเซลล์แขวนลอยเชื้อ (OD_{600}=1.0) ที่เจือจางกับอาหารเหลวสูตร MS เป็นอัตราส่วน 1:1

ปัจจัยที่ 5 ศึกษาระยะเวลาปลูกเชื้อ (inoculation) เป็นเวลา 1 3 และ 5 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 6 ศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* (co-cultivation) เป็นเวลา 3 และ 5 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสักโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

3.3.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

เตรียมเนื้อเยื่อสักโดยตัดชิ้นส่วนฐานใบ และข้อจากต้นอ่อนอายุประมาณ 2 เดือนซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (ปัจจัยที่ 1) แล้วทดสอบการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นเนื้อเยื่อ 3 วิธีการ (ปัจจัยที่ 2) คือ 1) นำเนื้อเยื่อสักวางบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยอาหารเหลวสูตร MS ใช้เข็มขนาด 30 G แทงบริเวณเนื้อเยื่อชิ้นส่วนละ 10 ครั้ง 2) ใช้ใบมีดกรีดบริเวณเนื้อเยื่อชิ้นส่วนละ 10 ครั้ง แล้วจึงนำไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* 3) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำโดยนำเนื้อเยื่อใส่ในขวดแก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อขนาด 4 ออนซ์ เติมอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่บริเวณกลางอ่าง และปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะเวลา 10 วินาที จากนั้นจึงย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงร่วมกับสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* เปรียบเทียบชนิดของชิ้นส่วนพืช และการทำบาดแผลแต่ละวิธีต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีน เพื่อให้ทราบชนิดของชิ้นส่วนและวิธีการสร้างบาดแผลที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนจากเชื้อ *A. tumefaciens* เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก

3.3.2 การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

เตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 และ AGL 1 (ปัจจัยที่ 3) ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 โดยนำเชื้อที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดข้ามคืน นำเชื้อที่ได้มา streak เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นเวลา 2 – 3 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาพมืดเป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อดังกล่าวปริมาตร 400 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในสภาพมืดเป็นเวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12 – 16 ชั่วโมง เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) จะได้ประมาณ 1.0 จึงนำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นระหว่างเซลล์แขวนลอยเชื้อกับอาหารเหลวสูตรเดิมเป็นสัดส่วน 1:1 เพื่อทดสอบปัจจัยที่ 4

3.3.3 การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสัก

ถ่ายยีนโดยนำฐานใบและข้อสักที่สร้างบาดแผลแล้ว มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 3 และ 5 ชั่วโมง (ปัจจัยที่ 5) จากนั้นนำเนื้อเยื่อออกมาซับเชื้อส่วนเกินบนกระดาษซับที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงร่วม (co-cultivation) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในที่มืดเป็นเวลานาน 3 และ 5 วัน (ปัจจัยที่ 6) จากนั้นกำจัดเชื้อโดยการล้างออกด้วยอาหารเหลวสูตร MS โดยวางบนเครื่องเขย่าประมาณ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางบนเครื่องเขย่า ประมาณ 30 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง ตรวจสอบการแสดงออกแบบชั่วคราว (transient expression) ของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987) เปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์ เพื่อคัดเลือกวิธีการที่ดีที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสัก โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยสุ่มตรวจเนื้อเยื่อหลังการถ่ายยีน ทำโดยแช่เนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว ในสารละลาย X-Gluc solution mixed (0.1 M $NaPO_4$ buffer, pH 7.0 10 mM EDTA 0.5 mM potassium ferricyanide 0.5 mM potassium ferrocyanide 1.0 mM X-glucuronide และ 0.1% Triton X-100) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดข้ามคืน ดูดสารละลายออก แล้วกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้เอธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผลการเกิดจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบบสเตอริโอ บันทึกจำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน และเปอร์เซ็นต์พื้นที่การติดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อเปรียบเทียบในแต่ละทรีตเมนต์

การทดลองที่ 4 การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่เนื้อเยื่อข้อสัก และการคัดเลือกต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน

4.1 การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นพลาสมิดที่มีขนาดประมาณ 12,867 คู่เบส ซึ่งมีการดัดแปลงมาจากพลาสมิด pCAMBIA 1304 โดยการแทนที่ยีน *hpt* ด้วยยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (*EPSPs*) นำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี Freeze/Thaw โดยนำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม เติมใน competent cell ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็งให้ละลาย ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 – 10 นาที แล้วเติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 – 4 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว LB ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 100 – 300 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบหาพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 โดยใช้เทคนิค PCR และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนข้อสัก

นำฐานใบและข้อของต้นสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาสร้างบาดแผล และถ่ายยีนตามวิธีการที่มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงจากการทดลองที่ 3 โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ประกอบด้วยยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *EPSPs* เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน จากนั้นกำจัดเชื้อโดยการล้างออกด้วยการเขย่าในอาหารเหลวสูตร MS ประมาณ 5 นาที 3 ครั้ง แล้วล้างออกด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วางบนเครื่องเขย่า ประมาณ 30 นาที 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำฐานใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงข้อต้นสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติม cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากการทดลองที่ 2) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วน แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อ และเติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากการทดลองที่ 2) เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในต้นสักที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืช ไกลโฟเสท โดยใช้เทคนิค PCR โดยมีวิธีการดังนี้

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต้นสัก

นำต้นสักที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกแล้วมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการ CTAB ดัดแปลงจาก Aldrich and Cullis (1993) โดยนำใบของต้นสักมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งที่เย็นจัดจนตัวอย่างละเอียด ย้ายตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม CTAB extraction buffer (2% CTAB 2% PVP 1.4 M NaCl 20 mM EDTA 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส โดยกลับหลอดไปมา 2 – 3 ครั้ง ทุก 15 นาที เป็นเวลา 30 นาที เติมสารผสม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใสที่ได้ จากนั้นเติมเอธานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนดีเอ็นเออยู่ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าตะกอนจะแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RnaseA (US Biological, USA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3.2 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* ในเนื้อเยื่อต้นสักที่เจริญบนอาหารคัดเลือก

นำดีเอ็นเอต้นสักที่สกัดได้มาตรวจสอบการคงอยู่ของยีน โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 919 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *EPSPs* ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,600 คู่เบส โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ของยีน *gus* ดังนี้ 1 X PCR buffer 2.5 mM $MgCl_2$ 150 µM dNTP mix 0.250 µM Primer GUS456-F 0.250 µM Primer GUS456-R 0.025 U *Taq* polymerase และ 500 ng DNA template ส่วนยีน *EPSPs* มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 1 X PCR buffer 2.5 mM $MgCl_2$ 150 µM dNTP mix 0.25 µM Primer EPSPs-F 0.25 µM Primer EPSPs-R 0.125 U *Taq* polymerase และ 500 ng DNA template

ทำปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน *gus* โดยนำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermo cycler (Biometra®, Germany) กำหนดโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 96°C	เป็นเวลา 3 นาที	
Denaturing	ที่อุณหภูมิ 96°C	เป็นเวลา 30 วินาที	30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 2 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 5 นาที	

โดยกำหนดโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ของยีน *EPSPs* ดังนี้

Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 95°C	เป็นเวลา 4 นาที	
Denaturing	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 1 นาที	30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 58°C	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 90 วินาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 10 นาที	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 40 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นแช่ล้างแผ่นเจลในน้ำสะอาดเป็นเวลานาน 10 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง gel document บันทึกภาพเจล

นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีไทด์โดยบริษัท 1st BASE (First BASE Laboratories Sdn. Bhd., Malaysia) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *EPSPs* โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)

การทดลองที่ 5 การตรวจสอบการถ่ายทอดของยีนในต้นสักรุ่น T_1 และ T_2

นำต้นสักสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีน หลังการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงโดยให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน ให้ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นรุ่นที่ 1 (T_1) จากนั้นนำแต่ละยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ในสภาพการเพาะเลี้ยงเหมือนเดิม เป็นระยะเวลา 2 เดือน จะได้รุ่นต้นสักรุ่นที่ 2 (T_2)

5.1 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในต้นสักรุ่น T_1 และ T_2 ด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในต้นสักรุ่น T_1 และ T_2 โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* และยีน *EPSPs* ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 4.3 แล้วจึงคัดเลือกต้นสักจากสายต้นที่มีการถ่ายยีนได้ถึงรุ่น T_2 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* โดยเทคนิค dot blot hybridization

5.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นสัก

สกัดดีเอ็นเอจากใบต้นสักที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก และให้ผลบวกจากการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR และต้นปกติอายุ 2 – 3 เดือน มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการ CTAB ตามวิธีการข้อ 4.3.1 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 8 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หยดดีเอ็นเอที่ต้มแล้วปริมาณ 2 ไมโครกรัม ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วจึงนำแผ่นเมมเบรนเข้าสู่ขั้นตอนการไฮบริไดซ์ต่อไป

5.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe)

เตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับทำปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น โดยใช้พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน *EPSPs* ติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบด้วย PCR DIG Labeling kit (Roch, USA) มาทำปฏิกิริยา PCR ใช้อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบยีน

นำผลผลิต PCR ที่ได้ ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร เติมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวก่อนนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2.3 การทำปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น และการตรวจสอบผลการไฮบริไดซ์เซชั่น

นำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 5.2.1 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (0.75 M NaCl 75 mM sodium citrate 0.1 % N-lauroylsarcosine 0.02 % SDS และ 1% blocking solution) โดยเติมสารละลายลงในหลอด hybridization ที่ใส่ไนลอนเมมเบรน ใช้ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ไนลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้งแล้วเติมสารละลาย hybridization ที่มีดีเอ็นเอตรวจสอบ (ตามวิธีการข้อ 5.2.2) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย low stringency buffer (2 X SSC และ 0.1 % SDS) โดยเติมสารละลายให้ท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (0.5 X SSC และ 0.1% SDS) โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (0.1 M maleic acid 0.15 M NaCl, pH 7.5 และ 0.3 % (v/v) Tween 20) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ย้ายแผ่นไนลอน-เมมเบรนลงในถุงพลาสติก เติมสารละลาย blocking solution (1% blocking reagent ใน maleic acid buffer) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดปากถุงแล้วนำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphate (Roche, USA.) ที่เจือจางด้วยสารละลาย blocking solution ในอัตราส่วน 1:10,000 เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ตรวจสอบผลการไฮบริไดซ์เซชั่นด้วยเทคนิค chemiluminescent detection ด้วยใช้ CDP -*star* (Roche, USA.) โดยนำแผ่นไนลอนเมมเบรนแช่ในสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris-HCl และ 0.1 M NaCl, pH 9.5) เป็นเวลา 3 นาทีโดยไม่ต้องเขย่า ย้ายแผ่นไนลอนเมมเบรนไปยังถุงพลาสติก เติม chemiluminescent substrate (CDP -*star*) ความเข้มข้น 0.062 มิลลิกรัม ที่ละลายใน detection buffer ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ให้ทั่วบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ปิดปากถุงให้สนิท วางในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง แล้วนำไปประกบกับแผ่นฟิล์มในห้องมืด นาน 15 – 30 นาที ล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer (Eastman Kodak Company, USA) และสารละลาย fixer (Eastman Kodak Company, USA) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นต้นแบบ

5.3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อต้นสัก

นำต้นสักที่คาดว่าได้รับยีน *gus* และ *EPSPs* จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และ dot blot hybridization มาย้ายเลี้ยงในสภาพโรงเรือน ใช้วัสดุปลูกเป็นดินผสม และทราย ในอัตราส่วนที่เท่ากัน คลุมถุงแล้ววางเลี้ยงในที่ร่ม 1 เดือน แล้วจึงย้ายไปอนุบาลในที่มีแสง 1 เดือน นำตัวอย่างใบของต้นสักมาสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ Laksana (2011) โดยบดตัวอย่างใบด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งที่เย็นจัดจนตัวอย่างละเอียด ย้ายตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่แช่เย็น เติม RNA extraction buffer (2% CTAB 2% PVP 2 M NaCl 25 mM EDTA 100 mM Tris-HCl และ 2 % α-mercaptoethanol, pH 8.0) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารผสม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม sodium chloride ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใสที่ได้ จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนอาร์เอ็นเอไว้ ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย RNase free water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วกำจัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างโดยเติม DNase I (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม 10 X reaction buffe DNase I ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5.3.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA ของต้นสัก

สังเคราะห์ frist stranded cDNA จากสายอาร์เอ็นต้นแบบ โดยใช้ชุด First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) โดยเตรียม reaction mixture ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม Oligo (dT) 22 primer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ dNTP mix ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมประกอบด้วย 5x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร dNTP mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Revert Aid M-MuL VRT ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในน้ำแข็งทันที กำจัดอาร์เอ็นเอโดยเติม RNaseH ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3.3 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีการ PCR

ใช้ frist stranded cDNA ที่ได้ เป็นแม่แบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Tg-NDPK* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกตลอดเวลา ยีน *gus* และยีน *EPSPs* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าสู่พืช โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Tg-NDPK* คือ *Tg-NDPK* forward: 5′-CTGCAAAGCCCTTCTTCAATGG-3′ และ *Tg-NDPK* reverse: 5′-CAGCAATTCCTTCTGGGAACCA-3′ ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 คู่เบส ไพรเมอร์ของยีน *gus* ดังนี้ GUS456 forward: 5′-AAACGGCAAGAAAAAGCAGTC-3′ และ GUS1375 reverse: 5′-CAGGCACAGCACATCAAAGAG-3′ ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 919 คู่เบส และไพรเมอร์ของยีน *EPSPs* ทั้งนี้ EPSPs forward: 5′-CCATTCCGCTCGAGATGGCACAAATTAACAACATGGC-3′ และ EPSPs reverse: 5′-ATCCACCGCTCGAGCGGTCATCAGGCAGCCTTCGTAT-3′ ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาใช้วิธีการ PCR เช่นเดียวกับข้อ 5.2 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

5.4 การตรวจสอบการคงอยู่ และจำนวนชุดของยีนด้วยเทคนิค Southern blot analysis

5.4.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นสัก

สกัดดีเอ็นเอจากใบต้นสักที่ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนชีวนิรภัยเป็นระยะเวลา 2 เดือน (ตามวิธีการข้อ 4.3.1) นำดีเอ็นเอที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เนื่องจากเอนไซม์ *Eco*RI ไม่มีจุดตัดในยีน *EPSPs* ตรวจสอบตำแหน่งตัดในชิ้นส่วนของยีนโดยใช้โปรแกรม NEBcutter V2.0 จากเวปไซต์ http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php นำดีเอ็นเอที่ย่อยแล้วมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรสเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5 X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

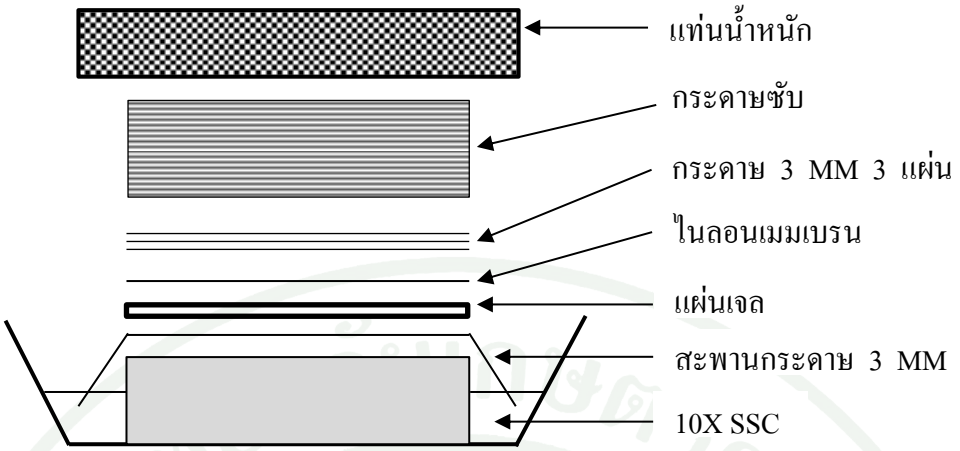
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4.2 การเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรน

ย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน (Hybond-N^+ Amersham, UK) โดยเตรียมดีเอ็นเอในเจลให้เป็นสายเดี่ยวก่อนด้วยการแช่เจลในสารละลาย depurination (0.25 M HCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำ deionize ที่นึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH และ 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วทำซ้ำขั้นตอนของการแช่เจลในสารละลาย denaturation แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำ deionize ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 และ 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วทำซ้ำขั้นตอนของการแช่เจลในสารละลาย ล้างเจลด้วยน้ำ deionize ที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วแช่เจลในสารละลาย 10 X SSC (1.5 M NaCl และ 0.15 M sodium citrate, pH 7.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นาน 10 นาที จึงนำไปประกอบในชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอ

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาบนไนลอนเมมเบรนดังภาพที่ 5 โดยวางกระดาษ Whatman 3 MM เป็นสะพานให้ปลายทั้ง 2 ด้านอยู่ในอ่างที่มีสารละลาย 10 X SSC วางแผ่นเจลคว่ำหน้าลงบนกระดาษ Whatman 3 MM จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล ชั้นต่อมาวางกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลายๆ ชั้น จากนั้นวางแท่นน้ำหนัก 500 กรัม ทับบนกระดาษซับอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง เพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจล ขึ้นมาติดอยู่บนไนลอนเมมเบรน เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอออกจากเจล แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 5 นาที นำเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาไฮบริไดซ์ในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 ชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาบนไนลอนเมมเบรน

5.4.3 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ

ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 5.2.2

5.4.4 การทำปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น และการตรวจสอบผลการไฮบริไดซ์เซชั่น

ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 5.2.3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 6 การตรวจสอบความทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท และการแสดงออกของยีน *EPSPs* ในต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ

นำต้นสักที่ตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *EPSPs* ด้วยวิธีการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลแล้วมาปลูก โดยใช้วัสดุปลูกเป็นดินผสม และทราย ผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน ปลูกในกระถางขนาด 2 นิ้ว รดน้ำให้ชุ่มและคลุมถุงเพื่อลดการคายน้ำ โดยย้ายปลูกในที่ร่มเป็นระยะเวลา 1 เดือน เปลี่ยนภาชนะเป็นกระถางขนาด 6 นิ้ว ใช้ดินผสมเป็นวัสดุปลูกเพียงอย่างเดียว อนุบาลต้นอ่อนในโรงเรือนชีวนิรภัย เป็นระยะเวลา 5 เดือน จนพืชตั้งตัวได้ จึงทดลองพ่นสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ความเข้มข้น 3.6 กรัมต่อลิตร บันทึกความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชต่อต้นสักภายหลังการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชเป็นระยะเวลา 3 7 และ 14 วัน โดยพิจารณาการซีดเหลืองและการตายของใบเปรียบเทียบกับต้นปกติ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสัก

1.1 ผลของสายต้น ชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการเกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนฐานใบและข้อของต้นสักจำนวน 3 สายต้น คือ 22C53 26C33 และ 16C7 บนอาหารแข็งสูตร ½ MS MS WPM และ SH เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกสายต้นมีการเกิดแคลลัส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเริ่มสร้างแคลลัสขนาดเล็กขึ้นที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สายต้น 22C53 มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสสูงสุด 57.68 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ย 2.66 มิลลิเมตร รองลงมาคือสายต้น 26C33 และ 16C7 โดยมีเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 54.18 และ 53.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ย 2.56 และ 2.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันนั้น พบว่า ฐานใบเกิดแคลลัสได้ดีกว่าข้อ โดยมีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสได้สูงสุด 65.10 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ย 3.14 มิลลิเมตร ในขณะที่ชิ้นส่วนข้อเกิดแคลลัส 45.41 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ย 1.84 มิลลิเมตร โดยที่ 2 สัปดาห์แรกหลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนฐานใบจะเริ่มมีการขยายขนาด และมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นแคลลัสแบบเกาะกันแน่น (compact callus) สีเหลืองอ่อน โดยพบที่บริเวณรอยตัดด้านฐานใบตรงส่วนของเส้นกลางใบ ทั้งนี้อาจเนื่องจากบริเวณฐานใบอาจมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญส่วนตาข้างติดอยู่บ้าง จึงพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ง่าย

สำหรับการชักนำแคลลัสบนสูตรอาหารแตกต่างกัน พบว่า การใช้อาหารสูตร MS และ SH มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารอื่นๆ และแคลลัสที่ชักนำได้มีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสจากสูตรอาหารอื่นเช่นกัน โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 75.00 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ชักนำได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 3.68 มิลลิเมตร ส่วนอาหารสูตร SH มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส 74.24 เปอร์เซ็นต์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 3.42 มิลลิเมตร การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS และ WPM มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส 53.97 และ 45.83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 2.54 และ 1.94 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS มีลักษณะเป็นแคลลัสแบบเกาะกันแน่นสีเหลืองอ่อน แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SH นั้น จะมีสีเหลืองอ่อนถึงซีดขาว ลักษณะมีทั้งที่เป็นแคลลัสแบบเกาะกันแน่น และแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) ส่วนแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร WPM เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีลักษณะเกาะกันแน่นสีเหลืองอ่อน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสจะเริ่มสร้างสารสีน้ำตาลบริเวณด้านที่สัมผัสอาหาร และเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 6)

จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบของสูตรอาหารนั้น พบว่า อาหารสูตร WPM มีความเข้มข้นของซัลเฟตสูงประมาณ 5 เท่าของอาหารสูตร MS ซึ่งอาจเป็นพิษต่อเซลล์ จึงส่งผลเสียต่อการพัฒนาของแคลลัสสัก นอกจากนี้อาหารสูตร SH และ WPM นั้นมีปริมาณไนโตรเจนน้อยเมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS จึงอาจไม่เพียงพอต่อการชักนำแคลลัสในสักได้ ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Catapan *et al*. (2001) ที่ได้รายงานผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Phyllanthus stipulatus* บนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าพืชสามารถสร้างแคลลัสได้เฉพาะอาหารสูตร MS เท่านั้น ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B5 SH White และ KM (Kao and Michayluk, 1975) ไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ เนื่องจากอาหารเหล่านี้มีปริมาณแอมโมเนียมต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS

จากการทดลองนี้สูตรอาหารที่สามารถชักนำแคลลัสได้มากที่สุดคืออาหารสูตร MS ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการชักนำแคลลัสในต้นสักของ Rijuta *et al*. (1996) ในขณะที่ Widiyanto *et al*. (2005) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องต้นสักเพื่อชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร WPM ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละสายพันธุ์ ที่ระยะของการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันนั้น พืชมีความต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เช่น รายงานที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ date palm (Al-Khayri, 2011) พบว่า พันธุ์ Berny สามารถสร้างแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร SH และ NN (Nitsch and Nitsch, 1969) และสามารถเกิด somatic embryo ได้บนอาหารสูตร WPM และ MS ส่วนพันธุ์ Khusab สร้างแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร White สามารถเกิด somatic embryo ได้บนอาหารสูตร White ส่วนพันธุ์ Barhee สามารถสร้างแคลลัสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SH White และ MS และสามารถเกิด somatic embryo ได้บน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

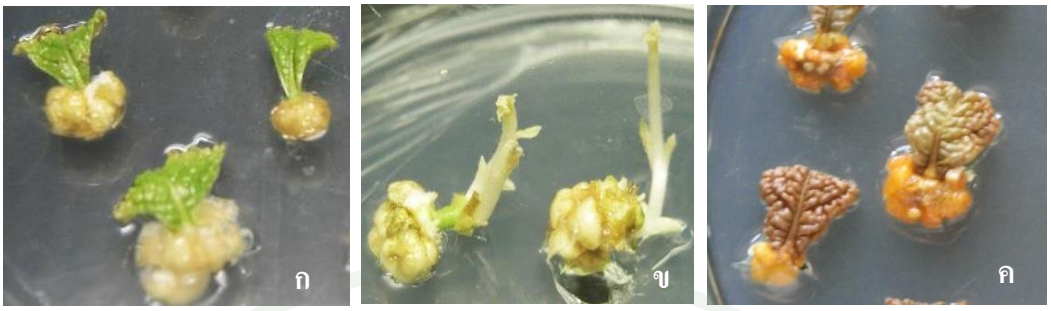
อาหารสูตร White และ SH ดังนั้นการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชิ้นส่วน สายพันธุ์ จึงมีความสำคัญในการเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะพืชที่มีความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่ำ เช่น ไม้ผล และไม้ยืนต้น

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสที่ชักนำจากข้อ และฐานใบของสักสายต้น 16C7 22C53 และ 26C33 บนอาหารสูตรต่างๆ เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ปัจจัยที่ทดสอบ		ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส (%)[1/]	Ø แคลลัส (มม.)[1/]
สายต้น	16C7	53.91	2.25
	22C53	57.68	2.66
	26C33	54.18	2.56
ชิ้นส่วน	ฐานใบ	65.10[a]	3.14[a]
	ข้อ	45.41[b]	1.84[b]
สูตรอาหาร	½ MS	53.97[b]	2.54[b]
	MS	75.00[a]	3.68[a]
	WPM	45.83[b]	1.94[b]
	SH	74.24[a]	3.42[a]
	C.V. (%)	39.12	52.96

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละปัจจัยที่ทดสอบ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ลักษณะแคลลัสสักสายต้น 22C53 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
ก. ลักษณะแคลลัสที่ชักนำจากฐานใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS
ข. ลักษณะแคลลัสที่ชักนำจากข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS
ค. ลักษณะแคลลัสที่ชักนำจากฐานใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร WPM

1.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำแคลลัสได้ดีจากการทดลอง 1.1 มาดัดแปลงด้วยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการเติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงฐานใบบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสได้สูงสุด 97.92 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่น สีเหลืองเขียว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.33 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2) ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อเติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสได้สูง 95.83 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 4.07 มิลลิเมตร ลักษณะแคลลัสเป็นแบบเกาะกันแน่นสีเหลือง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง (ตารางที่ 3)

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลดังกล่าวนี้ พบว่า การชักนำแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการเติม TDZ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Widiyanto *et al*. (2005) ซึ่งรายงานการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนปล้องของสัก โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร WPM ร่วมกับการเติม NAA และ BA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบเกาะแน่น ซึ่งเป็นแคลลัสที่มีแนวโน้มว่าสามารถเจริญเป็นยอดได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ การเติม BA เพียงอย่างเดียวหรือการเติม BA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ นั้นมีรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในพืชอื่นๆ อีกด้วย เช่น หญ้าแฝก (Leupin *et al*., 2000) และยี่หร่า (Tawfik and Noga, 2001)

จากการทดลองนี้พบว่าฐานใบของสักสามารถสร้างแคลลัสได้ในทุกทรีตเมนต์ที่ทดสอบ โดยมีการเพิ่มขยายขนาดของแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ (shoot regeneration) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรเดิมต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ลักษณะของแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลง โดยลักษณะแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตายในที่สุด ซึ่งในพืชหลายชนิดมีรายงานว่าถึงแม้จะชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด compact callus ได้ แต่ก็ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสเหล่านั้น เช่น การเพาะเลี้ยงแผ่นใบของ *Astragalus nezaketae* บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ (Erisen *et al*., 2010) พบว่าชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงแผ่นใบของ *Tylophora indica* บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นชิ้นส่วนสร้างแคลลัสขนาดเล็ก แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (Sahai *et al*., 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 การเกิดแคลลัสจากฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส (%)[1/]	Ø แคลลัส (มม.)[1/]
NAA	BA		
0.1	0.1	83.33[ab]	3.63[d]
	0.2	64.58[b]	7.07[ab]
	0.4	93.75[ab]	6.17[abc]
	0.6	97.92[a]	6.33[abc]
	1.0	91.67[ab]	5.70[abcd]
1.0	0.1	91.67[ab]	4.30[cd]
	0.2	87.50[ab]	6.20[abc]
	0.4	75.00[ab]	6.90[ab]
	0.6	79.17[ab]	7.53[a]
	1.0	91.67[ab]	4.93[bcd]
C.V. (%)		18.50	24.33

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 การเกิดแคลลัสจากฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

TDZ (มก./ล.)	การสร้างแคลลัส (%)[1/]	ขนาด Ø แคลลัส (มม.)[1/]
0.2	95.83[a]	4.07[b]
0.4	91.67[a]	5.40[a]
0.6	91.67[a]	3.87[b]
0.8	75.00[ab]	4.23[ab]
1.0	66.67[b]	4.81[ab]
C.V. (%)	25.39	26.87

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.3 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

การเพาะเลี้ยงข้อของสักสายต้น 22C53 ที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 – 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าลักษณะของการเกิดยอดจะเกิดจากบริเวณตาของข้อ ยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีจำนวน 3 ถึง 4 ข้อต่อยอด โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.2 ยอดต่อข้อ ยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ย 1.2 เซนติเมตร แต่ลักษณะของยอดที่ได้มีความสูงไม่สม่ำเสมอกัน และมีลักษณะฉ่ำน้ำ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้ BA ความเข้มข้นสูง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นน้อยกว่า 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดมีลักษณะปกติ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดจำนวน 3 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 1.58 เซนติเมตร อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดจำนวน 4.5 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 1.5 เซนติเมตร และบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างยอดจำนวน 5 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 1.28 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 7ก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทั้งนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสักโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น แม้ว่าในแต่ละข้อจะมีสองตา แต่มีเพียงยอดเดียวที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ส่วนอีกตามักไม่มีการพัฒนาของยอด มีโอกาสน้อยที่พบทั้งสองตาพัฒนาไปเป็นยอดได้เป็นปกติ ซึ่งจากผลการทดลองเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น พบว่า BA มีผลต่อการชักนำให้เกิดจำนวนยอดเพิ่มขึ้นในทุกๆ ความเข้มข้นที่ทดสอบ ผลดังกล่าวนี้เป็นไปในทำนองเดียวกับรายงานการของ Gupta *et al*. (1980) Devi *et al*. (1994) และ Sharma *et al*. (2000) พบว่าการเพิ่มปริมาณยอดของต้นสักสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม BA ซึ่ง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน มีผลในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ จึงทำให้สามารถกระตุ้นการสร้างยอดขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดของต้นสักโดยการเติม BA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ IAA ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นสัก พบว่าสามารถส่งเสริมการสร้างยอดได้ (Tiwari *et al.*, 2002) ทั้งนี้สัดส่วนของออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งที่พืชสร้างขึ้นเอง และที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงจะต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของยอด มีรายงานว่าการใช้ BA ที่ความเข้มข้นสูง 2.25 – 20.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นทำให้การสร้างยอดลดลง (Shirin *et al*., 2005) ในขณะที่การใช้ออกซิน และไซโตไคนินที่ความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด และการพัฒนาของยอดต้นสักได้อีกด้วย (Tiwari *et al.*, 2002)

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่ามีแคลลัสเกิดที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และพบอาการฉ่ำน้ำของยอดต้นสัก (vitrification หรือ hyperhydricity) ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากอิทธิพลของการใช้ BA ที่มีความเข้มข้นสูง สอดคล้องกับรายงานของ Abrie and Van Staden (2001) พบว่า การใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงในการเพิ่มปริมาณของ *Aloe polyphylla* มีผลให้เกิดอาการฉ่ำน้ำสูงขึ้น เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยประดับ ฟิโลเดนดรอน และเดหลี ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ BA สูง 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำเพิ่มขึ้น (Vardja and Vardja, 2001) ลักษณะเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำนี้เป็นปัญหาต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช ทำให้พืชเจริญเติบโตช้า และส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่ง McCown and Sellmer (1987) (อ้างโดย สมหวัง, 2540) อธิบายว่าสาเหตุของการเกิดอาการฉ่ำน้ำอาจเกิดเนื่องจาก พันธุกรรมของพืช ชนิดของภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง ความแข็งของอาหาร ระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน และระดับของไนโตรเจนในอาหารที่เพาะเลี้ยง จากการทดลองนี้พบว่าการเติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้ว่าจะเกิดยอดจำนวนสูงสุด แต่มีลักษณะของยอดที่ฉ่ำน้ำ ดังนั้นจึงเลือกใช้ BA ที่มีความเข้มข้นลดลงเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากให้จำนวนยอดไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ยอดที่มีลักษณะปกติ

ตารางที่ 4 ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจากข้อของสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

BA (มก./ล.)	จำนวนยอด (ยอด)[1/]	ความยาวยอด (ซม.)[1/]
0	1.5[c]	2.85[a]
1.0	3.0[b]	1.58[ab]
2.0	4.5[ab]	1.5[ab]
3.0	5.0[a]	1.28[b]
5.0	5.2[a]	1.2[b]
C.V. (%)	24.44	15.09

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้ยืนต้น และพืชชนิดอื่นบางชนิด พบว่ามีการนำ silver nitrate มาใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ มีผลทำให้ยอดเจริญเติบโตได้ดี และไม่มีลักษณะฉ่ำน้ำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ silver nitrate ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 – 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารแข็งสูตร MS เพื่อเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนข้อ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารที่เติม silver nitrate ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้ข้อที่เพาะเลี้ยงเกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 5.17 ยอดต่อข้อ ยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ย 1.33 และ 0.86 เซนติเมตรตามลำดับ รองลงมาได้แก่การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม silver nitrate ความเข้มข้น 5.0 และ 3.0 ตามลำดับ โดยมีจำนวนยอด 4.67 และ 4.33 ยอดต่อชิ้นส่วน มีความยาวยอดเฉลี่ย 0.89 และ 1.03 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 5) (ภาพที่ 7ข) ยอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารที่เติม silver nitrate ทุกความเข้มข้น ไม่แสดงอาการฉ่ำน้ำ แต่มีลักษณะข้อสั้นเป็นกระจุก จำนวนข้อเฉลี่ย 2 – 3 ข้อต่อยอด บางยอดไม่สามารถแยกออกเป็นยอดเดี่ยวได้ มีใบใหญ่สีเขียวเข้ม และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผิดรูปร่าง สอดคล้องกับการชักนำยอดในยางพารา ซึ่ง Sirisom and Te-chato (2012) รายงานการชักนำยอดจากเนื้อเยื่อปลายยอดยางพาราบนอาหารที่เติม silver nitrate ความเข้มข้น 1.0 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการสร้างยอดเฉลี่ย 5 ยอดต่อชิ้นส่วน ยอดที่เกิดขึ้นมีใบสีเขียวเข้ม เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม silver nitrate นอกจากนี้ Sridevi *et al*. (2010) รายงานการชักนำยอดของกาแฟ พบว่าการเติม silver nitrate ที่ความเข้มข้น 5 – 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำยอดจากข้อได้เพิ่มขึ้น และไม่พบยอดที่มีลักษณะฉ่ำน้ำ เช่นเดียวกับผลการทดลองในวนิลา *Vanilla planifolia* (Giridhar *et al*., 2001) ซึ่งพบว่าการเติม silver nitrate ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างยอดได้เฉลี่ย 5.6 ยอด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม silver nitrate มีการเจริญเพียงยอดเดียว และใน *Vitex negundo* L. (Steephen *et al*., 2010) พบว่าการเติม silver nitrate ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างยอดได้เฉลี่ย 38.36 ยอด ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม silver nitrate มีการสร้างยอด 14.16 ยอด และใน chicory (*Chichorium intybus*) (Bais *et al*., 2000) พบว่าสามารถชักนำยอดได้ 36.8 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม silver nitrate ความเข้มข้น 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม silver nitrate มีการสร้างยอด 19.2 ยอด

ตารางที่ 5 ผลของ silver nitrate หลังเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ silver nitrate เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

silver nitrate (มก./ล.)	จำนวนยอด (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)[1/]
0	4.67	2.17[a]
1.0	5.17	1.33[b]
2.0	5.17	0.86[c]
3.0	4.33	1.03[bc]
5.0	4.67	0.89[bc]
C.V. (%)	15.85	43.98

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการใช้ adenine sulfate ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ระบุว่า adenine sulfate ช่วยกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีขึ้น เนื่องจาก adenine sulfate อาจทำหน้าที่คล้ายสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน หรืออาจไปช่วยส่งเสริมการสร้างไซโตไคนินตามธรรมชาติ จึงส่งผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ และส่งเสริมการสร้างยอดได้ (Naaz *et al*., 2014) ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 10 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดจำนวน 5.83 ยอดต่อข้อ โดยยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ย 3.15 เซนติเมตร และให้ยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ มีจำนวนข้อเฉลี่ย 2 – 3 ข้อต่อยอด รองลงมาได้แก่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม adenine sulfate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้ยอดเฉลี่ย 5.17 ยอด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 3.77 เซนติเมตร ส่วนการเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดเฉลี่ย 4.83 ยอด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 3.78 เซนติเมตร และอาหารที่เติม adenine sulfate ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดเฉลี่ย 5 ยอด และมีความยาวยอดเฉลี่ย 4.32 เซนติเมตร (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 7ค)

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงข้อสักบนอาหารเติม adenine sulfate เพิ่มจำนวนยอดได้ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ adenine sulfate ในพืชอื่น เช่นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cucumis melo* L. จากรายงานของ Muruganantham *et al*. (2002) พบว่าเนื้อเยื่อสามารถสร้างยอดได้จำนวนเฉลี่ย 30 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L-Glutamine ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ adenine sulfate ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารที่ไม่เติม adenine sulfate มีการสร้างยอดเพียง 12 ยอด นอกจากนี้ยังมีรายงานการชักนำยอดในส้ม Kinnow mandarin (Siwach *et al*., 2012) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถสร้างยอดได้ 2.45 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่เมื่อเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.97 ยอดต่อชิ้นส่วน และในรายงานของ Naaz *et al*. (2014) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของ *Syzygium cumini* L. บนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างยอดได้ 8 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่เมื่อเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 14 ยอดต่อชิ้นส่วน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองในการชักนำยอดจำนวนมากของสักโดยการใช้ BA ร่วมกับ silver nitrate หรือ adenine sulfate พบว่าจำนวนยอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารเสริมดังกล่าว ไม่แตกต่างจากการเติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว อีกทั้งการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม silver nitrate ยังให้ยอดที่มีลักษณะผิดปกติ แยกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ยาก ดังนั้นในการเพิ่มปริมาณยอดสักจึงควรใช้ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ซึ่งนอกจากจะสามารถสร้างยอดได้จำนวนมากแล้ว ยอดที่ได้ยังมีลักษณะปกติอีกด้วย

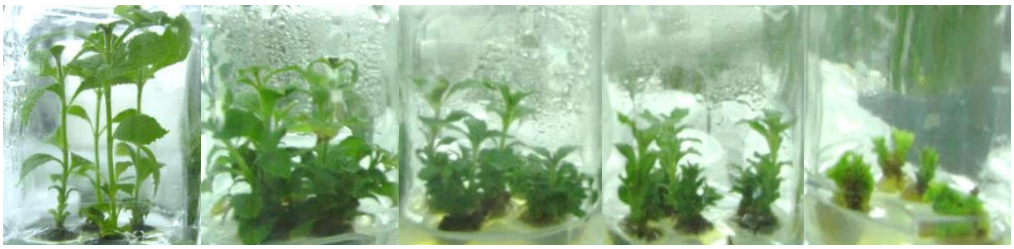
ตารางที่ 6 ผลของ adenine sulfate เมื่อเพาะเลี้ยงข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ adenine sulfate เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

adenine sulfate (มก./ล.)	จำนวนยอด (ยอด)[1/]	ความยาวยอด (ซม.)
0	5.00[b]	3.62
10	5.17[ab]	3.77
20	4.83[b]	3.78
30	5.00[b]	4.32
50	5.83[a]	3.15
C.V. (%)	12.53	30.06

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก

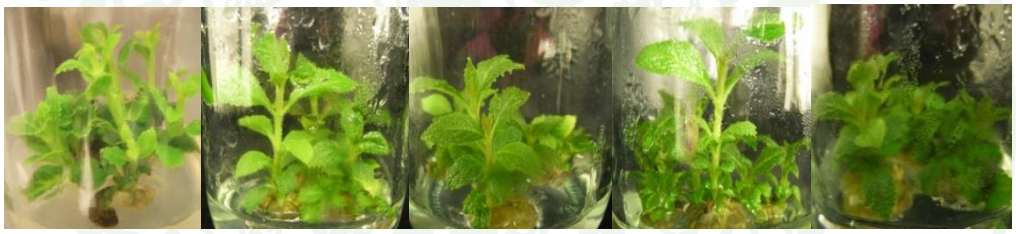


BA 0 มก./ล. 1 มก./ล. 2 มก./ล. 3 มก./ล. 5 มก./ล.

ข

BA 3 มก./ล. + SN 0 มก./ล. 1 มก./ล. 2 มก./ล. 3 มก./ล. 5 มก./ล.

ค



BA 3 มก./ล. + AS 0 มก./ล 10 มก./ล. 20 มก./ล. 30 มก./ล. 50 มก./ล.

ภาพที่ 7 ลักษณะยอดสักที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตรต่างๆ

ก อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 – 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ silver nitrate (SN) ความเข้มข้น 1.0 – 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ adenine sulfate (AS) ความเข้มข้น 10 – 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 การชักนำให้ต้นอ่อนเกิดราก

จากการนำยอดสักที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชักนำให้ออกรากบนอาหารแข็งสูตร ½ MS และ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีจำนวนยอดที่เกิดราก และจำนวนรากเฉลี่ย ในแต่ละสูตรอาหาร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยยอดสักที่เพาะเลี้ยงบน อาหารแข็งสูตร ½ MS มีเปอร์เซ็นต์การสร้างรากสูง 89.58 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.51 รากต่อยอด ส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นั้น มีเปอร์เซ็นต์การสร้างราก 81.25 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.46 รากต่อยอด (ตารางที่ 7)

การเกิดรากของยอดสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นั้น พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมหรือไม่เติม IBA นั้น มีการเกิดรากใกล้เคียงกัน แต่มีแนวโน้มว่ายอดสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดรากได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การสร้างราก 90.63 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.69 รากต่อยอด ส่วนการเพาะเลี้ยงยอดสักในอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การสร้างราก 81.25 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.47 รากต่อยอด ในขณะที่ยอดสักที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถสร้างรากได้ 84.38 เปอร์เซ็นต์ แต่รากที่ได้มีขนาดเล็ก มีจำนวนรากเฉลี่ย 1.29 รากต่อยอด (ภาพที่ 8) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซิน ทั้งที่พืชสร้างขึ้นเอง และที่ได้รับจากอาหาร ซึ่งสารในกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และการสร้างรากในพืช ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการชักนำให้เกิดรากของต้นอ่อนสักในสภาพปลอดเชื้อหลายงานวิจัย ซึ่งพบว่าการใช้ IBA ในช่วง 0.5 – 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีกว่าการไม่เติม IBA (Gangopadhyay *et al*., 2003; Gyves *et al*., 2007; Nor Aini *et al*., 2009) ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงควรใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้ยอดสักออกราก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ผลของสูตรอาหาร และ IBA ต่อการเกิดรากของยอดสัก เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ปัจจัยที่ทดสอบ		การสร้างราก (%)	จำนวนราก/ต้น
สูตรอาหาร	½ MS	89.58	1.51
	MS	81.25	1.46
IBA (มก./ล.)	0	84.38	1.29
	0.5	90.63	1.69
	1.0	81.25	1.47
C.V. (%)		20.99	36.22

สูตรอาหาร	IBA (มก./ล.)		
	0	0.5	1.0
½ MS			
MS			

ภาพที่ 8 ต้นอ่อนของสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS และ MS ร่วมกับการเติม IBA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองที่ 1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมกับการเกิดแคลลัส การชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อ และการชักนำให้ต้นอ่อนออกราก พบว่า การชักนำแคลลัสสัก ทำโดยเพาะเลี้ยงฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสที่ชักนำได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ จึงมีการศึกษาการชักนำยอดจำนวนมากจากข้อสัก เพื่อใช้ในการถ่ายยีน จากผลการทดลอง พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างจำนวนยอดเฉลี่ยสูง และการชักนำรากสักจากยอดนั้น พบว่า การเพาะเลี้ยงยอดสักบนอาหารแข็งสูตร ½ MS เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดสักสามารถสร้างรากได้ดี

การทดลองที่ 2 การทดสอบสารปฏิชีวนะ และสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่สัก

2.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B และสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่เหมาะสมในการกำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ในการถ่ายยีนนั้นภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการถ่ายยีน จำเป็นต้องมีการกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อเปิดโอกาสให้เซลล์ที่มียีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าไปเจริญเติบโตแข่งขันกับเซลล์ปกติได้ ดังนั้นการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารคัดเลือกที่เหมาะสมในการกำจัดเซลล์ปกติของพืชแต่ละชนิดจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ซึ่งหลักเกณฑ์ในการเลือกความเข้มข้นของสารคัดเลือกที่เหมาะสมนั้น คือเลือกใช้ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเซลล์ปกติได้ เนื่องจากพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมีความสามารถทนทานต่อสารคัดเลือกได้ที่ความเข้มข้นระดับหนึ่งเท่านั้น การทดลองนี้จึงได้ทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ hygromycin และสารไกลโฟเสท เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกชิ้นส่วนต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน

2.1.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่เหมาะสมในการกำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้กำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของสัก บนอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin ความเข้มข้น 0 – 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกความเข้มข้นที่ทดสอบส่งผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยับยั้งการเกิดแคลลัส และการเกิดยอด และมีการเกิดแคลลัสและการสร้างยอดลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี hygromycin ความเข้มข้นสูงขึ้น (ภาพที่ 9) โดยเนื้อเยื่อเริ่มซีดขาว บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และบางส่วนตายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงใน hygromycin ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เนื้อเยื่อสักตายทั้งหมด (ตารางที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Norwati *et al*. (2007) ที่ใช้ hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกชิ้นส่วนข้อสักภายหลังการถ่ายยีน

การใช้ hygromycin ความเข้มข้นสูงนั้นแม้ว่าจะสามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีนได้ดี แต่อาจส่งผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของพืชลดลง หรืออาจทำให้เซลล์ที่รอดชีวิตไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนการถ่ายยีนนั้นมีความอ่อนแอ พัฒนาขึ้นเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ยาก แต่การใช้สารคัดเลือกความเข้มข้นต่ำเกินไปอาจทำให้การคัดเลือกไม่มีประสิทธิภาพ เช่นชิ้นส่วนที่ไม่ได้สัมผัสสารคัดเลือกโดยตรงสามารถเจริญได้ หรืออาจมีเนื้อเยื่อบางส่วนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตไปพร้อมกับเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนได้ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบความเข้มข้นของ hygromycin ที่เหมาะสมในการคัดเลือกพืชที่ถ่ายยีนแต่ละชนิด เช่นการถ่ายยีนข้าว (Zuraida *et al*., 2013) พบว่าการใช้ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวได้ดี ซึ่งเมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าวไปใช้คัดเลือก พบว่าแคลลัสไม่สามารถสร้างยอดได้ แต่การใช้ hygromycin ที่ความเข้มข้น 10 – 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสสามารถสร้างยอดได้ และสามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้

ดังนั้นในการคัดเลือกเนื้อเยื่อสักภายหลังการถ่ายยีนจึงควรใช้ hygromycin ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมด ทั้งนี้การพัฒนาระบบการคัดเลือกที่เหมาะสม เช่น การคัดเลือกต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานขึ้น (Aoki *et al*., 2002) หรือการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะภายหลังการถ่ายยีนแล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก (Norwati *et al*., 2007) จะช่วยทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถซ่อมแซมตัวเองและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารคัดเลือก

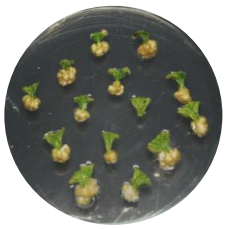
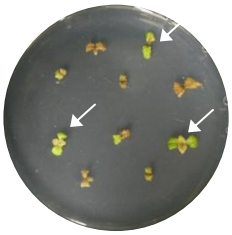
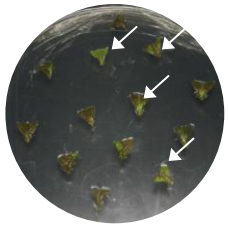
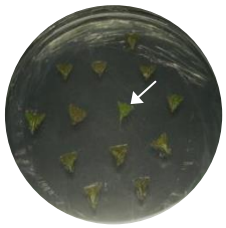
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

hygromycin (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน (%)[1/]		
	ยอด	ข้อ	ฐานใบ
0	0[b]	0[b]	0[c]
3	71.67[a]	86.67[a]	61.67[b]
5	85[a]	100[a]	98.33[a]
10	100[a]	100[a]	100[a]
20	100[a]	100[a]	100[a]
C.V. (%)	56.22	52.51	56.15

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

hygromycin (มก./ล.)	ชิ้นส่วนพืชที่ทดสอบ		
	ยอด	ข้อ	ฐานใบ
0			
3			
5			
10			
20			

ภาพที่ 9 ลักษณะชิ้นส่วนสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่ความเข้มข้น 0 – 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ (ศรชี้คือชิ้นส่วนสักบางส่วนที่ยังมีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม hygromycin)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่เหมาะสมในการกำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

การทดสอบความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (glyphosate) ที่เหมาะสมในการคัดเลือกชิ้นส่วนสักที่ได้รับการถ่ายยีน *EPSPs* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงลักษณะต้านทานไกลโฟเสท โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด และข้อ บนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงฐานใบของสักบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารมีการเติมสารไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้น 0 169 507 845 และ 1,690 มิลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 507 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตายทั้งหมดในระยะเวลา 5 สัปดาห์ ส่วนการคัดเลือกบนอาหารที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนยอดมีอัตราการตาย 90 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนข้อและฐานใบมีอัตราการตาย 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและยอดในระยะเวลา 2 สัปดาห์แรกหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 และ 507 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการพัฒนาของยอด และการเจริญของใบที่ปลายยอด แต่ชิ้นส่วนฐานใบพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น แต่หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 และ 507 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีอาการซีดขาว และชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 507 มิลลิกรัมต่อลิตรตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์ (ภาพที่ 10) ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือกที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้นสูง 845 และ 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อเริ่มมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และตายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงควรเลือกใช้ไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 507 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกชิ้นส่วนของสักที่ได้รับการถ่ายยีน

อย่างไรก็ตามการคัดเลือกพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชมักมีอัตราความสำเร็จต่ำเนื่องจากเนื้อเยื่อพืชบางส่วนได้ถูกทำลายในขั้นตอนการถ่ายยีน ทำให้เมื่อคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้นสูง เนื้อเยื่ออาจไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์บางส่วนถูกทำลายระหว่างขั้นตอนการถ่ายยีน ทำให้ยีนต้านทานไม่สามารถแสดงออกลักษณะต้านทานได้ การใช้ไกลโฟเสทเป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมีการนำไปใช้หลากหลายวิธี และความเข้มข้นของไกลโฟเสทที่ใช้มีหลายระดับ ขึ้นอยู่กับชนิด และชิ้นส่วนพืช เช่นในยาสูบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

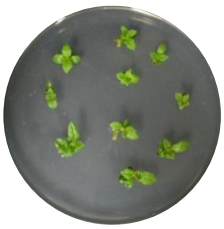
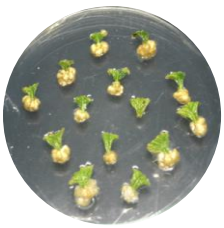
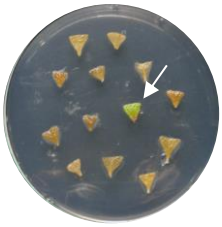
พบว่าวิธีการคัดเลือกชิ้นส่วนหลังการถ่ายยีนต้านทานไกลโฟเสทที่มีประสิทธิภาพดี คือการเติมไกลโฟเสทที่ความเข้มข้นต่ำ 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเพิ่มความเข้มข้นขึ้นทุก 2 สัปดาห์ จนไกลโฟเสทมีความเข้มข้นสูงสุด 16.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ ในขณะที่การเติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 16.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตั้งแต่สัปดาห์แรกที่คัดเลือกทำให้เนื้อเยื่อซีดขาวทั้งหมดภายในระยะเวลา 1 เดือน (Roudsari *et al*., 2009) ส่วนการคัดเลือก zonal pelargoniums ที่ได้รับการถ่ายยีน *CP4-EPSPS* พบว่าการใช้ไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 25.35 มิลลิกรัมต่อลิตร การคัดเลือกในระยะแรกเป็นเวลา 42 วัน แล้วลดความเข้มข้นลงเป็น 16.9 มิลลิกรัมต่อลิตร คัดเลือกต่อเป็นระยะเวลา 63 วัน จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 8.45 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นวิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพสามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนได้ (Boase *et al*., 2012)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสท เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

glyphosate (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน (%)[1/]		
	ยอด	ข้อ	ฐานใบ
0	0[b]	0[b]	0[b]
169	90.00[a]	95.00[a]	95.00[a]
507	100[a]	100[a]	100[a]
845	100[a]	100[a]	100[a]
1,690	100[a]	100[a]	100[a]
C.V. (%)	47.57	46.24	46.24

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

glyphosate (มก./ล.)	ชิ้นส่วนพืชที่ทดสอบ		
	ยอด	ข้อ	ฐานใบ
0			
169			
507			
845			
1,690			

ภาพที่ 10 ลักษณะชิ้นส่วนสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 0 – 1,690 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ (ศรชี้คือชิ้นส่วนสักบางส่วนที่ยังมีชีวิต เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสท)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

สารปฏิชีวนะ cefotaxime จัดอยู่ในกลุ่ม cephalosporin ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียโดยการขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีแม้ใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จึงนิยมใช้ในขั้นตอนการกำจัดเชื้อหลังการถ่ายยีนโดยวิธีการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ (Mathias and Boyd, 1986)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บริเวณผิวของชิ้นส่วนสักหลังจากการถ่ายยีน โดยการนำชิ้นส่วนยอด ข้อ และฐานใบ มาปลูกเชื้อด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (OD_{600}=1) เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 0 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนสักบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 300 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วน แต่การใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยังมีเนื้อเยื่อสักบางชิ้นปนเปื้อนเชื้อ *A. tumefaciens* โดยชิ้นส่วนสักบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนยอดมีการปลอดเชื้อ 50 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนข้อมีอัตราการปลอดเชื้อ 62.5 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนฐานใบมีอัตราการปลอดเชื้อ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนยอดมีการปลอดเชื้อ 75 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนข้อมีการปลอดเชื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนฐานใบมีการปลอดเชื้อ 87.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อสักจึงไม่ควรต่ำกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในพืชอื่นๆ เช่น การถ่ายยีนของ Flax (Koronfel, 1998) พบว่าการใช้ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วน hypocotyl หลังการถ่ายยีนได้และการถ่ายยีนในเบญจมาศโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ (Teixeira da Silva and Fukai, 2001) พบว่ามีการใช้ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อที่ความเข้มข้น 125 – 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการถ่ายยีน *Achyranthes bidentata* (Duan *et al*., 2013) พบว่าการใช้ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น ไม่พบชิ้นส่วนที่ปนเปื้อนเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

A. tumefaciens ซึ่งในภาพรวมการใช้ความเข้มข้นของ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* อยู่ในช่วง 100 – 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วนต่างๆ ของสัก ที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

cefotaxime (มก./ล.)	ชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ (%)[1/]		
	ยอด	ข้อ	ฐานใบ
0	0[c]	0[c]	0[c]
200	50[b]	62.5[b]	50[b]
250	75[ab]	100[a]	87.5[a]
300	100[a]	100[a]	100[a]
350	100[a]	100[a]	100[a]
400	100[a]	100[a]	100[a]
C.V. (%)	64.85	55.10	61.58

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.3 ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อสัก

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อสัก โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ และฐานใบบนอาหารสูตรที่เหมาะสม และเติม cefotaxime ความเข้มข้น 0 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ สามารถสร้างยอดได้ทุกชิ้นส่วน (100 เปอร์เซ็นต์) มีชิ้นส่วนที่เกิดยอดจำนวนมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cefotaxime ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนฐานใบ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถสร้างแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสมีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cefotaxime แต่เมื่อความเข้มข้นของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cefotaxime สูงขึ้น พบว่ามีผลทำให้เกิดแคลลัสได้ลดลง (ตารางที่ 11) โดยอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถเกิดแคลลัสได้ 95.83 เปอร์เซ็นต์ ที่ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถเกิดแคลลัสได้ 91.67 เปอร์เซ็นต์ ที่ cefotaxime ความเข้มข้น 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถเกิดแคลลัสได้ 83.33 เปอร์เซ็นต์ และที่ cefotaxime ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถเกิดแคลลัสได้ 70.83 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้จากการศึกษา พบว่าชิ้นส่วนข้อสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ในทุกความเข้มข้นมีการสร้างยอดจำนวนมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cefotaxime ส่วนแคลลัสที่พัฒนาจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้นต่ำ มีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cefotaxime ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yepes and Aldwinckle (1994) พบว่าความเข้มข้นของ cefotaxime ที่ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลส่งเสริมในการเกิดแคลลัสจากใบของแอปเปิ้ล เช่นเดียวกับรายงานของ Mathias and Makusa (1987) พบว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่ำมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดยอดจากแคลลัสของข้าวสาลี ส่วนการเติม cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารจะเพิ่มการเกิด somatic embryogenesis และเพิ่มการสร้างยอดจากแคลลัสอ้อย (Mittal *et al*., 2009) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรืออาจเกิดการแตกตัวให้สารที่ไปกระตุ้นการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีผลไปช่วยส่งเสริมการสร้างแคลลัส และยอด (Mathias and Mukasa, 1987) อย่างไรก็ตามจากการทดลองในสักนี้พบว่าการใช้ cefotaxime ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีการเกิดแคลลัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแคลลัสที่ได้มีแนวโน้มที่มีขนาดเล็กลงด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hoffmann and Vieira (2000) ที่พบว่าความสามารถในการพัฒนาเป็นยอดของถั่ว *Stylosanthes guianesis* ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Yu *et al*., (2001) พบว่า การเติม cefotaxime ปริมาณที่เหมาะสมในอาหาร สามารถส่งเสริมการเจริญของแคลลัส และมีการเกิด somatic embryo ในมะละกอเพิ่มขึ้น แต่การใช้ cefotaxime ความเข้มข้นสูง 375 – 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเกิดแคลลัส ส่วน Li *et al*. (2007) พบว่าการใช้ cefotaxime ที่ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการสร้าง somatic embryo จากชิ้นส่วนใบของ London plane tree เช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการสร้างยอดจากข้อ และการเกิดแคลลัสจากฐานใบของสัก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

cefotaxime (มก./ล.)	ชิ้นส่วนที่เกิดยอด (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ข้อ)[1/]	ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส (%)[1/]	Ø แคลลัส (มม.)[1/]
0	100	4.92	100[a]	5.15[bc]
200	100	5.45	100[a]	7.72[a]
250	100	5.54	95.83[a]	7.04[ab]
300	100	5.58	91.67[a]	7.01[ab]
350	100	5.50	83.33[ab]	5.32[bc]
400	100	5.21	70.83[b]	4.33[c]
C.V. (%)	0	24.40	32.93	54.34

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ในขั้นตอนการถ่ายยีนมีการใช้สารปฏิชีวนะ เพื่อการกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเพื่อกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* หลังจากการถ่ายยีน ซึ่งการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาของพืชได้ ดังนั้นการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารคัดเลือกที่เหมาะสมจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช จากผลการทดลอง พบว่า การใช้ hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 507 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ ส่วนการใช้ cefotaxime พบว่าที่ความเข้มข้น 250 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บริเวณพื้นผิวชิ้นส่วนของสักได้ดี และการใช้ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 200 – 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีผลยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นการใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime เพื่อกำจัดเชื้อหลังการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสักในการทดลองขั้นต่อไป ควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นในระดับที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีและไม่มีผลทำลายชิ้นส่วนพืช โดยที่เนื้อเยื่อพืชยังสามารถสร้างยอดและแคลลัสได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 3 ศึกษาวิธีการถ่ายยีนที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อต้นสัก โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ประกอบไปด้วยหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ พันธุ์และชิ้นส่วนพืช วิธีการสร้างบาดแผลบนเนื้อเยื่อพืช เวคเตอร์และพลาสมิด ความเข้มข้นและสายพันธุ์เชื้อ สารกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงร่วม วิธีการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังการถ่ายยีน เทคนิคและระยะเวลาในการปลูกเชื้อและเลี้ยงร่วม ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการถ่ายยีน 6 ปัจจัย ได้แก่ ชิ้นส่วนพืช การสร้างบาดแผลบนเนื้อเยื่อพืช สายพันธุ์และความเข้มข้นเชื้อ *A. tumefaciens* ระยะเวลาในการปลูกเชื้อและการเลี้ยงร่วม โดยตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนจากการแสดงออกชั่วคราวของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay

ปัจจัยที่ 1 การศึกษาผลของชิ้นส่วนต้นสักต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนนั้นมีความแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด จากการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนฐานใบ และข้อสัก โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว โดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนมีชิ้นส่วนที่มีสีน้ำเงินปรากฏ (ภาพที่ 11) โดยการใช้ข้อในการถ่ายยีนทำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 91.71 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* ที่ 58.32 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ส่วนการใช้ฐานใบ พบว่ามีชิ้นเนื้อเยื่อที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ที่ 75.19 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* ที่ 44.75 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 12) เนื่องจากชิ้นส่วนฐานใบมีลักษณะบางเกิดการบอบช้ำได้ง่ายเมื่อผ่านขั้นตอนการถ่ายยีน และขั้นตอนการกำจัดเชื้อ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำกว่าชิ้นส่วนข้อซึ่งมีความแข็งแรง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัญหาหนึ่งที่พบในการถ่ายยีนในไม้ยืนต้นที่สำคัญ คือความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการเลือกชิ้นส่วนที่เหมาะสมทั้งในการถ่ายยีนและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชแต่ละชนิด เช่นในอัลมอนด์ แอปเปิ้ล แอพริคอท และบลูเบอร์รี่ พบว่าการใช้ชิ้นส่วนใบในการถ่ายยีนมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง ชิ้นส่วนสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ส่วนพืชบางชนิดที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนได้ มีการใช้วิธีการเพิ่มปริมาณยอดให้ได้จำนวนมากเพื่อเพิ่มโอกาสให้เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ เช่นในส้มและเชอร์รี่ นอกจากนี้ยังมีการใช้ embryo epicotyl และ hypocotyl อีกด้วย ทั้งนี้การเลือกชิ้นส่วนที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีน และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้น จึงมีความจำเป็นในการถ่ายยีนในไม้ยืนต้น (Piqueras *et al*., 2010)

จากการทดลองพบว่าชิ้นส่วนข้อมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง และมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญส่วนตาข้างซึ่งเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมาก ในขณะที่ชิ้นส่วนฐานใบถึงแม้จะมีการถ่ายยีนเข้าไปยังเนื้อเยื่อได้ แต่เนื่องจากชิ้นส่วนฐานใบไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ดังนั้นในการถ่ายยีนของสักจึงควรเลือกใช้ชิ้นส่วนข้อ

ตารางที่ 12 ผลของชิ้นส่วนพืชต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ

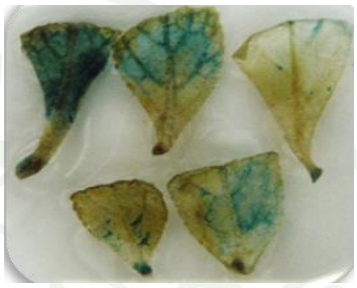
ชิ้นส่วนพืช	ชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]	พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]
ฐานใบ	75.19[b]	44.75[b]
ข้อ	91.71[a]	58.32[a]
C.V. (%)	22.63	36.80

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก ข

ค ง



ภาพที่ 11 ลักษณะชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงินจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว เมื่อตรวจโดยวิธี GUS histochemical assay
ก, ข ชิ้นส่วนข้อ และฐานใบสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
ค, ง ชิ้นส่วนข้อ และฐานใบสักหลังจากการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 3 วัน

ปัจจัยที่ 2 การศึกษาผลของการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนต้นสักต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

การสร้างบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมายเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *A. tumefaciens* ประสบความสำเร็จ เพราะนอกจากจะกระตุ้นให้พืชปล่อยสารประกอบ phenolic ที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการถ่ายยีนของ *A. tumefaciens* แล้วยังกระตุ้นให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ได้ดีอีกด้วย (Binns and Thomashow, 1988)

จากการสร้างบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อฐานใบ และข้อสัก ก่อนการถ่ายยีนที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ การสร้างบาดแผลขนาดเล็กโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เป็นเวลา 10 วินาที การใช้ใบมีดกรีด และการสร้างบาดแผลโดยการใช้เข็มขนาด 30G แทงที่ผิวเนื้อเยื่อ เมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) ภายหลังการถ่ายยีน พบว่า การใช้ใบมีดกรีด และการใช้เข็มแทงเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เนื้อเยื่อมีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นเนื้อเยื่อที่ทดสอบ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ติดสีน้ำเงินจากการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แสดงออกของยีน *gus* อยู่ที่ 55 และ 54 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเนื้อเยื่อตามลำดับ (ตารางที่ 13) ส่วนการ sonication นั้น มีชิ้นเนื้อเยื่อที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* สูงถึง 89.90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเนื้อเยื่อ เนื่องจากการทำบาดแผลโดยใช้ใบมีดกรีด และการใช้เข็มทำให้เนื้อเยื่อมีบาดแผลค่อนข้างใหญ่ แม้ว่าส่งผลให้เชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้บริเวณบาดแผลได้ง่าย แต่มีพื้นที่การแสดงออกของยีนจำกัดเฉพาะบริเวณที่ทำบาดแผล ส่วนการ sonication เป็นการสร้างบาดแผลขนาดเล็กโดยคลื่นเสียงความถี่สูงมีผลทำให้เนื้อเยื่อที่ผิวปริแตกเกิดเป็นแผลเล็กๆ จำนวนมากทั่วทั้งเนื้อเยื่อ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* สูง

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ เช่นรายงานของ Bakshi *et al*. (2011) พบว่าการสร้างบาดแผลให้ชิ้นส่วนข้อของถั่วพุ่ม (cowpea) ก่อนการปลูกเชื้อโดยการ sonication เป็นระยะเวลา 20 วินาที มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงถึง 79 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้เข็มแทงมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการถ่ายยีนในสบู่ดำ (Khemkladngoen *et al*., 2011) พบว่าการสร้างบาดแผลโดยการ sonication เป็นระยะเวลา 1 นาที ร่วมกับการเขย่าร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* เป็นระยะเวลา 9 นาที มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง นอกจากนี้การถ่ายยีนใน somatic embryo ของถั่วเหลือง (Trick and Finer, 1998) พบว่าการ sonication เป็นระยะเวลา 30 วินาที สามารถเพิ่มการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* ได้สูงกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ทำบาดแผลถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การ sonication เป็นระยะเวลา 100 และ 300 วินาที มีประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนและการพัฒนาของชิ้นส่วนลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ระยะเวลาในการ sonication ที่นานเกินไป ทำให้เนื้อเยื่อพืชเสียหายจนไม่สามารถพัฒนาได้

จากผลการทดลองนี้การสร้างบาดแผลให้กับเนื้อเยื่อก่อนการถ่ายยีนโดยวิธีการใช้ใบมีดกรีด และการใช้เข็มแทง ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง แต่พบว่ามีพื้นที่การแสดงออกของยีนต่ำ ในขณะที่การ sonication มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนรองลงมา แต่มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีนสูง ซึ่งเกิดจากบาดแผลขนาดเล็กที่เกิดขึ้นสามารถเพิ่มโอกาสให้เชื้อเข้าบุกรุกได้มากขึ้น ดังนั้นการถ่ายยีนในสักจึงควรเลือกใช้วิธีการ sonication เป็นระยะเวลา 10 วินาที ในการสร้างบาดแผลให้กับชิ้นส่วนต้นสักก่อนการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ผลของการสร้างบาดแผลบนชิ้นส่วนฐานใบ และข้อสักต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ

วิธีการสร้างบาดแผล	ชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]	พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]
คลื่นเสียงความถี่สูง	80.00[b]	89.90[a]
ใบมีดกรีด	100.00[a]	55.00[b]
เข็มแทง	100.00[a]	54.00[b]
C.V. (%)	13.96	36.79

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ปัจจัยที่ 3 การศึกษาผลของสายพันธุ์เชื้อ *A. tumefaciens* ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

จากการศึกษาผลของสายพันธุ์เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรง (hypervirulent strain) มีการพัฒนา Ti – plasmid ให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง จากการทดลองได้บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 1304 ในเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ฐานใบ และข้อสัก โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 เป็นพาหะ มีชิ้นเนื้อเยื่อที่ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* เฉลี่ยสูงถึง 83.29 เปอร์เซ็นต์ และมีพื้นที่ของชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน 55.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการใช้สายพันธุ์ AGL 1 ที่มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน 72.89 เปอร์เซ็นต์ และมีพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน 46.18 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

A. tumefaciens ต่างสายพันธุ์จะมี Ti plasmid ที่กำหนดการสร้างสาร opine ที่มีชนิดที่แตกต่างกัน เมื่อมีการถ่ายโอน T - DNA เข้าไปในโครโมโซมของพืชแล้ว แบคทีเรียสามารถใช้กระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชสังเคราะห์ opine ซึ่งเป็นกลุ่มของสารประกอบที่แตกต่างจากสารที่พืชสร้างขึ้น เพื่อใช้เป็นสารอาหาร แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน ให้แก่แบคทีเรีย ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียได้ โดยที่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 จะมีการสร้างสาร opine ชนิด agropine ในขณะที่สายพันธุ์ AGL 1 สร้างสาร succinamopine ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่แตกต่างกันมีความสามารถ และความจำเพาะในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชแต่ละชนิด หรือพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันได้แตกต่างกัน เช่นรายงานของ Jube and Borthakur (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ ที่ *A. tumefaciens* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ EHA 105 LBA 4404 และ C58C1 ซึ่งแต่ละสายพันธุ์สร้าง opine ที่แตกต่างกัน คือ agropine octopine และ nopaline ตามลำดับ โดยมีการบรรจุพลาสมิด pCAMBIA 3201 ทุกสายพันธุ์ และนำไปใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Leucaena leucocephala* พบว่าชิ้นส่วนพืชที่ถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ C58C1 มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ EHA 105 และ LBA 4404 ส่วน Widiyanto *et al*. (2004) ได้ศึกษาการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 และ GV3101 เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสัก พบว่า การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 มีการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูง แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการถ่ายยีนในพืชแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน

จากการทดสอบผลของสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีนในสัก พบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีน และมีพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงินสูงกว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL 1 จึงควรเลือกใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ในการถ่ายยีนในสักต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ผลของสายพันธุ์เชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ

สายพันธุ์เชื้อ *A.tumefaciens*	ชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]	พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]
AGL 1	72.89[b]	46.18[b]
EHA 105	83.29[a]	55.43[a]
C.V. (%)	21.16	26.74

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ปัจจัยที่ 4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* เมื่อใช้เชื้อที่มีค่า OD_{600}=1.0 เปรียบเทียบกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ (OD_{600}=1.0) ที่เจือจางกับอาหารเหลวสูตร MS เป็นอัตราส่วน 1:1 ในการถ่ายยีนเข้าสู่ฐานใบ และข้อของสัก พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่ OD_{600}=1.0 ทำให้มีชิ้นเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด คือ 85.88 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* อยู่ที่ 43.66 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ *A. tumefaciens* ที่เจือจางอัตราส่วน 1:1 มีชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน 72.27 เปอร์เซ็นต์ และมีพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน 56.70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เนื่องจากเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เพิ่มโอกาสให้เซลล์พืชถูก *A. tumefaciens* เข้าบุกรุกได้มากขึ้น แต่ความเข้มข้นของเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้กำจัดได้ยากในภายหลัง ซึ่งส่งผลในทางอ้อมให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำลง จึงจำเป็นต้องทดสอบหาความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนของพืชแต่ละชนิด เช่น การถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย (รักชนก, 2549) พบว่าการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 5.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (OD_{600}=1) มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง ส่วนการถ่ายยีนในข้าว และข้าวโพด พบว่าการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง (Ishida *et al*., 1996; Hiei *et al*., 1997) ส่วน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การถ่ายยีนในข้าวสาลีแม้จะพบว่าการใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นสูงมีโอกาสทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงเมื่อตรวจสอบด้วยการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว แต่กลับพบว่าประสิทธิภาพของการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ไม่สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *gus* แบบถาวร โดยพบว่าการใช้ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 0.5×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวสาลีสูงที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นเชื้อสูง หรือต่ำกว่านี้ส่งผลให้การแสดงออกของยีน *gus* ทั้งแบบชั่วคราว และแบบถาวรลดลง และพบอีกว่าการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีผลทำลายเซลล์พืช และส่งผลเสียต่อการฟื้นตัวของเซลล์พืชในระหว่างการคัดเลือก ทำให้ประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนแบบถาวรลดลง อย่างไรก็ตามการใช้ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้นสูงนั้น Zhang *et al*. (2003) รายงานว่าอาจมีความจำเป็นต่อพืชที่มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำ เช่นไม้ยืนต้น ไม้ผล ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า การถ่ายยีนในสักโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ควรเลือกใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ค่า OD_{600}=1.0 โดยไม่มีการเจือจาง ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง

ตารางที่ 15 ผลของความเข้มข้นเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ในเนื้อเยื่อสัก หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ

ความเข้มข้นเชื้อ *A. tumefaciens*	ชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]	พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]
OD_{600}=1.0	85.88[a]	43.66[a]
OD_{600}=1.0 และเจือจาง 1:1	72.27[b]	56.70[b]
C.V. (%)	20.29	28.49

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยที่ 5 การศึกษาระยะเวลาการปลูกเชื้อต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

การปลูกเชื้อ เป็นขั้นตอนที่ช่วยทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* ยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยหากใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการถ่ายยีน แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานเกินไปจะส่งผลทำให้อัตราการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดต้นของพืชลดลง (Yong *et al*., 2006)

จากการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนเนื้อเยื่อสัก พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 3 และ 5 ชั่วโมง มีชิ้นเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงใกล้เคียงกัน คือ 85.53 และ 88.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* อยู่ที่ 48.99 และ 60.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง มีชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินเพียง 77.25 เปอร์เซ็นต์ และพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน 47.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16)

ระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่ใช้ในการถ่ายยีนมีผลต่อการเข้ายึดเกาะของเชื้อกับบริเวณผิวเนื้อเยื่อ ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่เหมาะสมนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนของพืช แล้วยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความเข้มข้นของเชื้ออีกด้วย เช่นการถ่ายยีนใน London plane tree มีการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนภายหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 2 – 20 นาที พบว่าการปลูกเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ OD_{600}= 0.8 – 1.0 และใช้เวลาในการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 8 10 หรือ 20 นาทีมีการแสดงออกของยีน *gus* สูง 60 – 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้เชื้อที่ OD_{600} น้อยกว่า 0.4 ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* ในทุกๆ ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ทดสอบ นอกจากนี้การใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่นานถึง 20 นาที ยังส่งผลเสียต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน (Li *et al*., 2007) ส่วนการถ่ายยีนในถั่วเหลือง ภายหลังการทดสอบระยะเวลาปลูกเชื้อ 30 นาที ถึง 5 ชั่วโมง พบว่าการปลูกเชื้อที่ OD_{600}=1.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการถ่ายยีน และอัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อสูงสุด ในขณะที่การปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที มีอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนเพิ่มขึ้น แต่มีการแสดงออกของยีน *gus* ลดลง (Zia *et al*., 2010)

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ พบว่าระยะเวลาการปลูกเชื้อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนสักคือ 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่มีพื้นที่การแสดงออกของยีน และมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง เนื้อเยื่อสามารถฟื้นตัวได้ภายหลังการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ผลของระยะเวลาในการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในเนื้อเยื่อสัก ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ

ระยะเวลาบ่มเชื้อ (ชม.)	ชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน (%)	พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]
1	77.25	47.42[b]
3	85.53	48.99[b]
5	88.81	60.06[a]
C.V. (%)	22.32	30.00

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ปัจจัยที่ 6 การศึกษาระยะเวลาการ co-cultivation ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* (co-cultivation) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เนื่องจากในระยะนี้จะมีการถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่จีโนมของพืช และเป็นช่วงที่เซลล์พืชต้องการระยะเวลาในการปรับตัว และฟื้นฟูเซลล์เนื่องจากมีการรับยีนที่แปลกปลอมเข้าไป การเพาะเลี้ยงร่วมในระยะเวลาสั้นๆ อาจทำให้การถ่ายยีนไม่สมบูรณ์ ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลง แต่ถ้าเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเกินไปจะทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* เจริญปกคลุมชิ้นส่วน ทำให้กำจัดได้ยาก และอาจทำให้เนื้อเยื่อเสียหายไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ ซึ่งเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่ในพืชชนิดเดียวกันแต่ใช้ชิ้นส่วนต่างกัน เมื่อนำมาถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* อาจต้องการระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่ต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการปรับตัวของเซลล์พืช (Mannan *et al*., 2009)

จากการศึกษาการใช้ระยะเวลา co-cultivation ในการถ่ายยีนของสัก ที่ระยะเวลา 3 และ 5 วัน พบว่า ระยะเวลา co-cultivation ที่ 3 และ 5 วัน ให้เปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 82.00 และ 84.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* อยู่ที่ 51.26 และ 51.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลา co-cultivation ที่นานขึ้นแม้จะมีรายงานว่ามีผลทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น แต่ไม่ควรนานเกินไป เนื่องจากจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มากขึ้นทำให้กำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อพืชในภายหลังทำได้ยาก อาจส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ และยังลดประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนอีกด้วย (Cervera *et al*., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Li *et al*. (2007) ซึ่งได้ศึกษาระยะเวลาในการ co-cultivation ที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนใน London plane tree ที่ระยะเวลา 2 – 6 วัน พบว่า การ co-cultivation เป็นระยะเวลา 4 วันมีการแสดงออกของยีน *gus* สูงประมาณ 60 – 70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการ co-cultivation เป็นระยะเวลา 5 - 6 วัน แต่การ co-cultivation เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมาก และพบการเกิด necrosis ของชิ้นส่วนใบที่ถ่ายยีน

ดังนั้นระยะเวลาในการ co-cultivation ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนในสักจึงควรใช้ที่ระยะเวลา 3 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ชิ้นส่วนเจริญเติบโตได้ และมีเชื้อแบคทีเรียเจริญในปริมาณที่สามารถกำจัดได้ และยังเป็นการลดเวลาในขั้นตอนการถ่ายยีนได้อีกด้วย

ตารางที่ 17 ผลของระยะเวลาเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในเนื้อเยื่อสัก ตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นพาหะ

ระยะเวลาเลี้ยงร่วม (วัน)	จำนวนชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]	พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน (%)[1/]
3	82.00	51.26
5	84.90	51.82
C.V. (%)	22.64	36.80

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนในสักโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว โดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้ข้อในการถ่ายยีนมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าฐานใบของสัก ในการถ่ายยีนเข้าสู่สักในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ชิ้นส่วนข้อ ซึ่งนอกจากจะมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงแล้ว จากการทดลองที่ 1 ยังพบว่าข้อสามารถพัฒนาสร้างยอดจำนวนมากได้ ในขณะที่ฐานใบไม่สามารถพัฒนาสร้างยอดจากแคลลัสได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการพัฒนาของเนื้อเยื่อหลังการถ่ายยีน ที่พบได้บ่อยครั้งในไม้ผล ไม้ยืนต้น ส่วนการศึกษาวิธีการสร้างบาดแผลที่เหมาะสมให้กับชิ้นส่วนของสักก่อนการถ่ายยีน พบว่าการ sonication เป็นระยะเวลา 10 วินาที สามารถสร้างบาดแผลขนาดเล็กจำนวนมากกระจายทั่วทั้งชิ้นส่วน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* จึงมีพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงินสูงกว่าการใช้ใบมีดกรีดและการใช้เข็มแทง ส่วนการศึกษาเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในสัก พบว่า เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูง โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ การใช้ *A. tumefaciens* ที่มีค่า OD_{600}=1.0 โดยไม่เจือจาง และการศึกษาระยะเวลาในการปลูกเชื้อ และเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับชิ้นส่วน พบว่า การปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับชิ้นส่วน เป็นระยะเวลา 3 วัน เป็นวิธีการถ่ายยีนในสักที่มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นในการทดลองที่ 4 จึงใช้ชิ้นส่วนพืชเชื้อ *A. tumefaciens* และวิธีการที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ในการถ่ายยีนเข้าสู่สัก

การทดลองที่ 4 การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่เนื้อเยื่อข้อสัก และการคัดเลือกต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน

4.1 การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPSs 1304

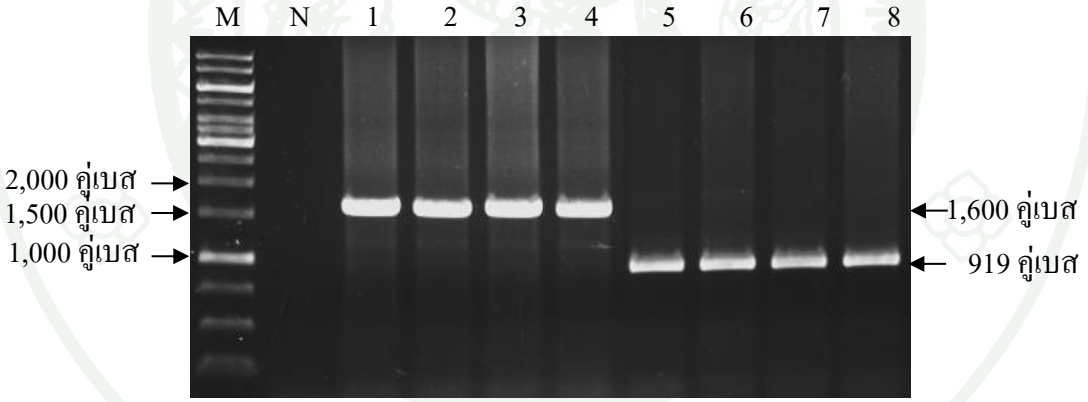
การบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมีขนาด 12,867 คู่เบสเข้าสู่ competent cell ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 โดยวิธี freeze/thaw เพื่อใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีน แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากผลการทดลองพบว่า *A. tumefaciens* สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้จำนวน 4 โคโลนี

นำเชื้อจากแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดโดยวิธี alkaline lysis แล้วตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Eco*RI แล้วแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I มีรูปแบบการตัดของเอนไซม์ 2 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส และ 11,267 คู่เบส และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 12,867 คู่เบส ซึ่งตรงตามตำแหน่งของพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

จากนั้นตรวจสอบซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีการ PCR ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* โดยใช้พลาสมิดที่สกัดได้จากเชื้อที่คัดเลือกไว้เป็นต้นแบบ แล้วแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ผลผลิต PCR ของยีน *gus* มีขนาดประมาณ 919 คู่เบส และยีน *EPSPs* ขนาด 1,600 คู่เบส ซึ่งตรงกับผลที่ควรจะได้ (ภาพที่ 12) จึงสามารถยืนยันได้ว่าพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ได้ถูกถ่ายเข้าไปยัง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105



ภาพที่ 12 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* และ *gus* ใน *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธี PCR

M 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

N น้ำกลั่น (negative control)

1 – 4 ผลผลิต PCR ที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *EPSPs* ขนาดแถบดีเอ็นเอ 1,600 คู่เบส

5 – 8 ผลผลิต PCR ที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *gus* ขนาดแถบดีเอ็นเอ 919 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนข้อของสัก

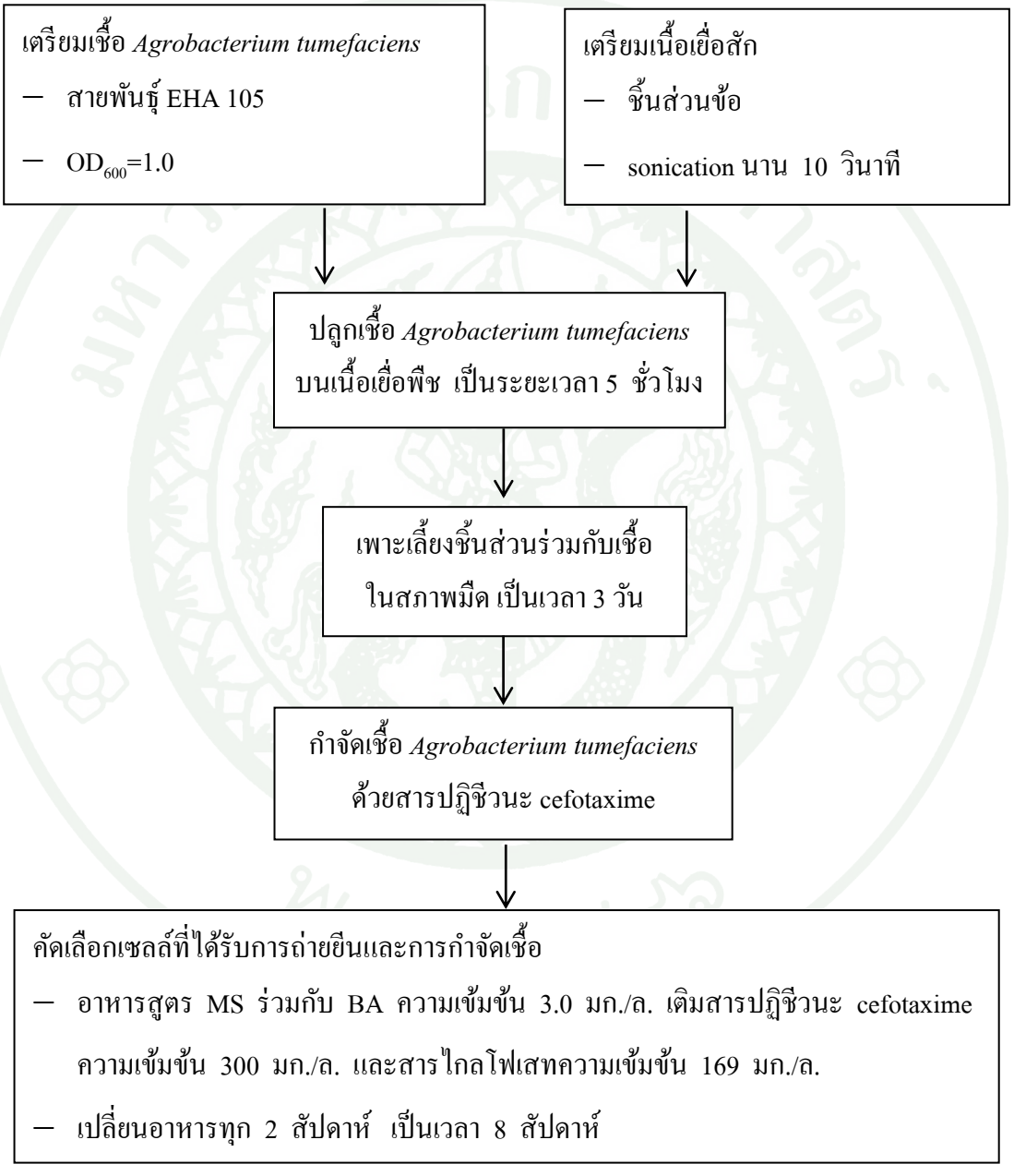
การถ่ายยีนเข้าสู่ข้อสักโดยการใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ โดยใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงจากการทดลองที่ 3 (ภาพที่ 13) มีปัจจัยที่สำคัญคือ การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 และมีค่า OD_{600}=1.0 โดยนำเนื้อเยื่อที่ทำบาดแผลโดยการ sonication นาน 10 วินาที มาบ่มแช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับการเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในอาหารทั้งสำหรับการเลี้ยงเชื้อ การปลูกเชื้อ และอาหารสำหรับ co-cultivation โดยปลูกเชื้อนาน 5 ชั่วโมง และ co-cultivation นาน 3 วัน จากนั้นจึงกำจัดเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงไปบนอาหารแข็งที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังขั้นตอนการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* เนื้อเยื่อบางส่วนมีอาการบอบช้ำและตาย จึงนำเนื้อเยื่อส่วนที่เหลือไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกต่อไป

สำหรับชิ้นส่วนข้อสักที่พบว่ามีชีวิตรอดหลังผ่านขั้นตอนการถ่ายยีนมีจำนวน 124 ข้อ เมื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อหลังการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* และสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อมีเริ่มมีลักษณะซีดขาว ในระยะ 2 สัปดาห์แรกหลังการคัดเลือก เนื้อเยื่อบางส่วนตาย ที่ 4 สัปดาห์หลังการคัดเลือก เนื้อเยื่อบางส่วนยังคงมีชีวิต เริ่มมีตาอ่อนปรากฏ บางข้อตาอ่อนมีสีซีดขาว จึงคัดเลือกเฉพาะข้อที่มีตาอ่อนสีเขียว ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตรเดิมต่อจนครบ 8 สัปดาห์ แล้วจึงแยกเป็นต้นเดี่ยวได้จำนวน 27 ต้น จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลการถ่ายยีนในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 14)

ในการเติมสารไกลโฟเสทเพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนจากการทดลองที่ 2 พบว่าที่ความเข้มข้น 507 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมด แต่จากการนำความเข้มข้นดังกล่าวไปใช้คัดเลือกภายหลังการถ่ายยีน พบว่า ไม่มีชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก ซึ่งอาจเกิดจากเนื้อเยื่อพืชเกิดความเสียหายระหว่างขั้นตอนการถ่ายยีน ทำให้ไม่สามารถพัฒนาบนอาหารที่เติมไกลโฟเสทที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

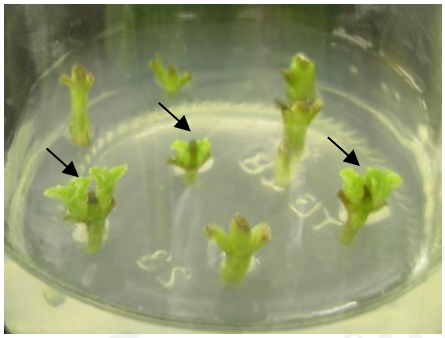
ความเข้มข้นสูงได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ไกลโฟเสทที่ความเข้มข้นต่ำลง คือ 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมในอาหารคัดเลือก เพื่อให้ชิ้นส่วนข้อที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถพัฒนาสร้างยอดได้ นอกจากนี้ในการทดลองมีการคัดเลือกซ้ำบนอาหารคัดเลือก เพื่อเป็นการกำจัดยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



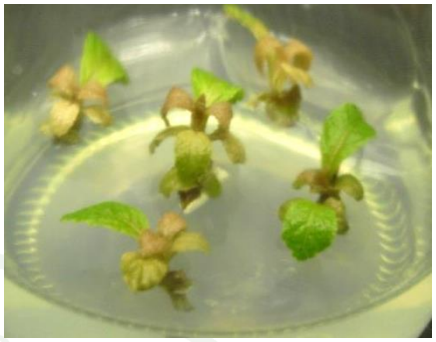
ภาพที่ 13 แผนผังขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่ข้อสักโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

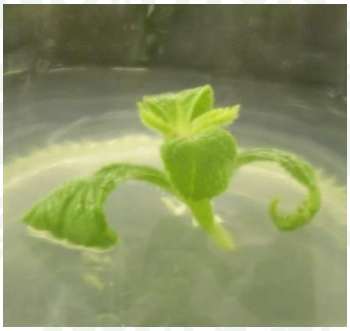
ก



ข



ค



ภาพที่ 14 การเกิดยอดใหม่หลังการคัดเลือกโดยวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก ยอดใหม่ที่เกิดขึ้น หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ศรชี้)

ข ยอดใหม่มีลักษณะซีดขาว หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ค ต้นอ่อนที่เจริญบนอาหารคัดเลือกหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* และ *EPSPs* โดยสกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นสักที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกจำนวน 27 ต้น และใบจากต้นที่ไม่ได้ถ่ายยีน จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 919 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *EPSPs* จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 1,600 คู่เบส แล้วนำผลของปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าจากการตรวจสอบต้นสักที่เจริญบนอาหารคัดเลือกจำนวน 27 ต้น พบการมีอยู่ของยีน *gus* โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบสทุกต้นที่ทดสอบ ส่วนการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส พบจำนวน 23 ต้น คือต้นหมายเลข 1 2 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 และ 25 (ภาพที่ 15) และยืนยันได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นยีน *EPSPs* โดยการสุ่มตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เพิ่มปริมาณได้จากต้นที่ 4 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือน (max identity) กับยีน *CP4EPSPS* ของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม 99 เปอร์เซ็นต์ (accession no. AB209952.1) (ตารางที่ 18) โดยมีค่า max score เท่ากับ 1849 bits ซึ่งค่า score จะแสดงถึงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ที่ของยีนในฐานข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบ โดยรวมส่วนของ mismatch และ gap ถ้าค่า score มีค่าสูงแสดงว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์มีความสัมพันธ์หรือความเหมือนกับ accession number นั้นสูง และจากตารางมีค่า total score เท่ากับ 2312 bits ซึ่งค่า total score คือผลรวมของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละสายที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในฐานข้อมูล ถ้าค่า total score เท่ากับ max score แสดงว่ามีนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งเส้น ถูกนำมาเปรียบเทียบกับยีนที่สนใจ แต่ถ้าค่า total score มากกว่า max score แสดงว่ามีนิวคลีโอไทด์มากกว่าหนึ่งเส้นจากฐานข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบกับยีนที่สนใจ ส่วนค่า query cover มีค่า 96 เปอร์เซ็นต์ และค่า E-value เท่ากับ 0 แสดงว่านิวคลีโอไทด์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของยีนในฐานข้อมูลสูง ซึ่งค่า E-value น้อยแสดงว่าค่าที่วิเคราะห์ได้มีความน่าเชื่อถือสูง (Agostino, 2012)

กรณีที่ต้นสักจำนวน 4 ต้นตรวจไม่พบการคงอยู่ของยีน *EPSPs* แต่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท อาจเกิดจากกรณีของการ escape ของเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากข้อสักที่ใช้มีขนาดใหญ่ ทำให้มีบางส่วนไม่สัมผัสอาหารคัดเลือก ส่งผลให้การคัดเลือกเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ หรือการพัฒนาของยอดที่ไม่ได้รับยีนนี้อาจเกิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการได้รับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตจากเซลล์ที่ต้านทาน ทำให้สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก ซึ่งมีรายงานการเกิด escape ในการถ่ายยีนในพืชหลายชนิด เช่นการถ่ายยีนในส้ม (Pena *et al*., 2004) หลังจากคัดเลือกชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ร่วมกับการเติม kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารคัดเลือก เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay พบว่ามียอดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญได้ จำนวน 63 ยอด จากยอดที่เกิดขึ้นใหม่จำนวน 117 ยอด นอกจากนี้ยังมีรายงานการ escape ของพืชหลายชนิดที่ใช้ชิ้นส่วนปลายยอดในการถ่ายยีน เช่น พุทรา (Gu *et al*., 2008) และ poplar (Yevtushenko and Misra, 2010)

จากผลการทดลองพบว่าต้นสักทั้ง 4 ต้นนี้มียีน *gus* แต่ไม่พบการคงอยู่ของยีน *EPSPs* ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากขั้นตอนการนำชิ้นส่วนของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้น การเคลื่อนย้ายยีนจะเกิดขึ้นที่บริเวณ right border ของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชก่อน (Ward and Barnes, 1988) ซึ่งในพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่ใช้ในการทดลองนี้มียีน *gus* อยู่บริเวณ right border ของ T-DNA ส่วนยีน *EPSPs* อยู่ค่อนมาทางด้าน left border (ภาพที่ 16) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าส่วนของยีน *EPSPs* ที่อยู่ต่อจากยีน *gus* อาจเกิดการขาดหายไปบางส่วนระหว่างขั้นตอนการถ่ายยีนไปยังเซลล์ของเนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบ หรืออาจเกิดจากการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ endonuclease หรือ 3′ - 5′ exonuclease ที่อยู่ภายในเซลล์ (Pitzschke and Hirt, 2010) ทำให้การส่งถ่าย T-DNA ในส่วนของยีน *EPSPs* ที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

อย่างไรก็ตามการเจริญของยอดที่ไม่ได้รับยีนบนอาหารคัดเลือก อาจเกิดจากยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น chimera คือมีเซลล์บางส่วนที่มียีนที่ถูกถ่ายเข้าไปปะปนอยู่กับเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีการกระจายของเซลล์ที่มียีนในเนื้อเยื่ออย่างไม่สม่ำเสมอ ทำให้เซลล์บางส่วนแสดงลักษณะต้านทานต่อสารไกลโฟเสทได้ ยอดจึงสามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือก แต่เนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบอาจเป็นส่วนที่ไม่มียีน หรือมีปริมาณน้อยไม่สามารถตรวจสอบได้

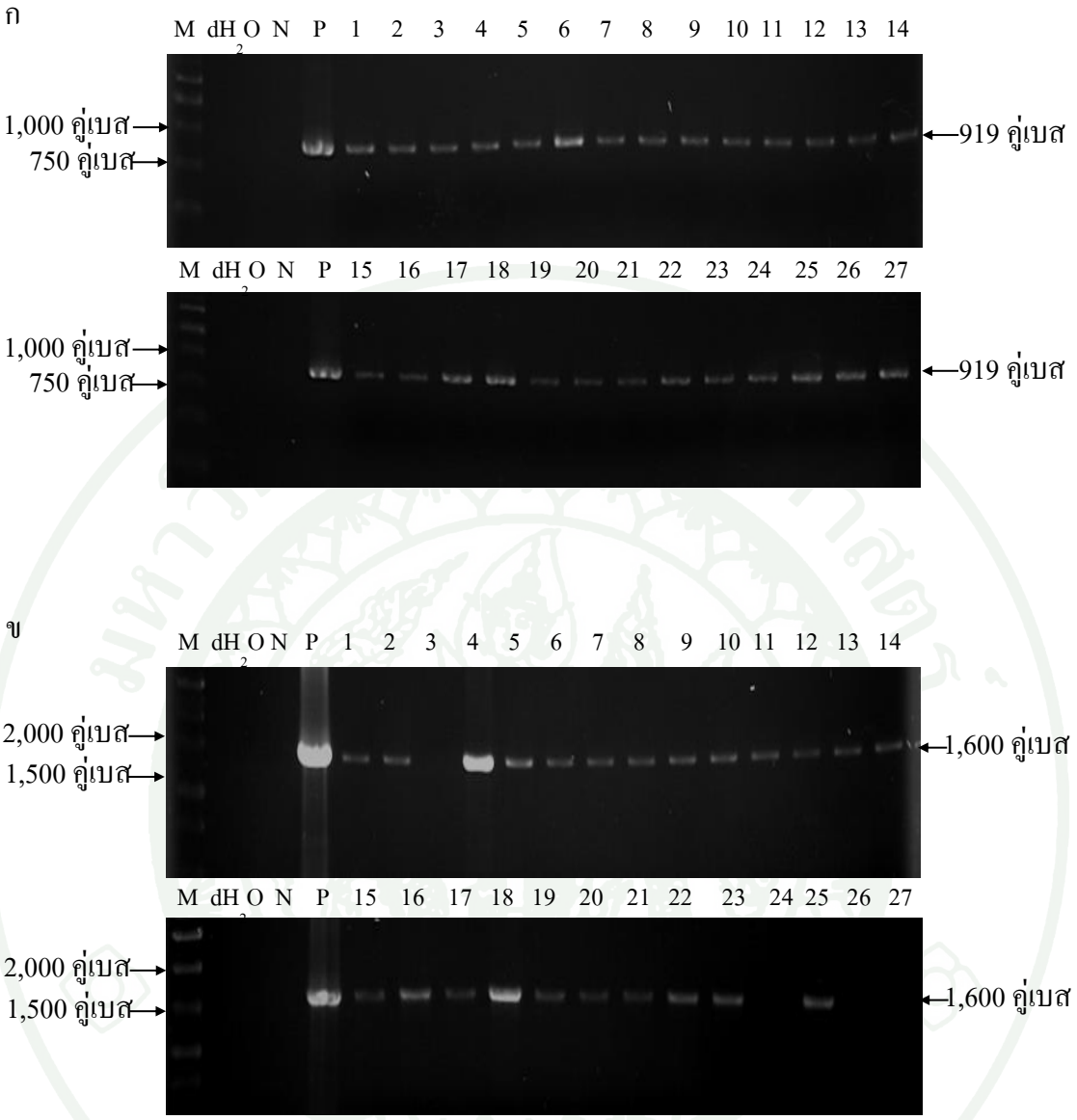
จากผลการทดลองนี้พบว่ายอดที่เจริญบนอาหารคัดเลือกมีทั้งที่ได้รับยีน และที่ไม่ได้รับยีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกอีกครั้งโดยการชักนำยอดจำนวนมากและเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกซ้ำ เพื่อเพิ่มโอกาสให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการพัฒนา และกำจัดต้นที่เกิดจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *EPSPs* ในต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน กับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max Identity	Accession
Glycine max transgenic *cp4epsps* gene for 5-enol-pyruvylshikimate-3-phospate synthase class 2 precursor, complete cds	1849	2312	96%	0.0	99%	AB209952.1
Glycine max CP4EPSPS gene, complete cds	1804	1804	93%	0.0	98%	AF464188.1
Synthetic construct CP4EPSPS protein (*CP4EPSPS*) gene, complete cds	1804	2022	93%	0.0	99%	AY125353.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* ในจีโนมของเนื้อเยื่อส่วนใบจากยอดสักที่เจริญบนอาหารคัดเลือก จำนวน 27 ต้น โดยใช้เทคนิค PCR

ก การมีอยู่ของยีน *gus* แสดงผลโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส

ข การมีอยู่ของยีน *EPSPs* แสดงผลโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส

M เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas, USA)

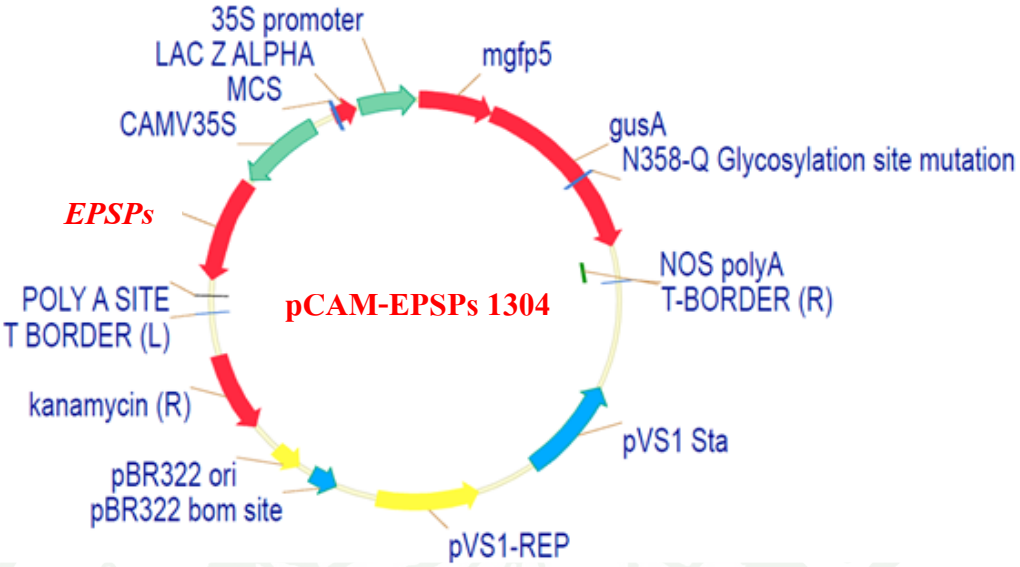
dH_2O น้ำกลั่น (negative control)

N ดีเอ็นเอจากใบสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

1 – 27 ดีเอ็นเอจากใบสักที่เจริญบนอาหารคัดเลือก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 แผนที่โครงสร้างพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 5 การตรวจสอบการถ่ายทอดของยีนในสักรุ่น T_1 และ T_2

การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนโดยการคัดเลือกซ้ำในยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีความจำเป็นสำหรับการถ่ายยีนที่ใช้ชิ้นส่วนยอดเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพื่อเป็นการยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง โดยการนำยอดสักจำนวน 23 ต้นที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก และตรวจสอบด้วยวิธี PCR แล้วว่ามียีน *gus* และยีน *EPSPs* เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนของต้นเดิมต้นที่ 5 6 8 และ 15 มีลักษณะซีดขาวและตายในที่สุด ส่วนต้นหมายเลข 12 และ 15 เกิดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงไม่สามารถสร้างยอดในรุ่นถัดไปจากต้นเดิมเหล่านี้ได้ ดังนั้นยอดใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นต้นรุ่นที่ 1 (T_1) ซึ่งมีจำนวน 55 ต้น พัฒนามาจากต้นเดิมจำนวน 17 ต้น โดยแต่ละยอดเดิม (T_0) สามารถสร้างยอดใหม่ในรุ่น T_1 ได้ 2 – 6 ยอด (ตารางที่ 19)

5.1 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในต้นรุ่น T_1 และ T_2 ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำยอดรุ่น T_1 จำนวน 55 ยอดมาเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ อีกครั้งหนึ่ง พบว่าต้นรุ่น T_1 ที่พัฒนาจากต้นเดิมต้นที่ 9 18 และ 25 เกิดลักษณะซีดขาวของยอดและตายหลังการคัดเลือก และต้นรุ่น T_1 ที่พัฒนาจากต้นเดิมต้นที่ 4 และ 23 พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงไม่สามารถสร้างยอดใหม่ได้ ส่วนยอดที่เกิดจากต้น T_1 ที่พัฒนาจากต้น T_0 ต้นที่ 17 และ 22 มีลักษณะแคระแกร็น ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นยอดรุ่นที่ 2 (T_2) ซึ่งพบว่ามีจำนวน 109 ยอดนั้น เป็นยอดที่พัฒนามาจากต้น T_1 จำนวน 41 ต้น จากทั้งหมดจำนวน 55 ต้น โดยเกิดยอดเฉลี่ย 2 – 4 ยอดต่อต้น (ตารางที่ 19)

จากนั้นตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* ในต้นรุ่น T_2 ด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถแบ่งต้นรุ่น T_2 ได้ 4 กลุ่ม (ตารางที่ 19) คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 1 ตรวจสอบไม่พบการมีอยู่ของทั้งสองยีน คือ ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 1 และ 2

กลุ่มที่ 2 ตรวจสอบพบยีน *gus* เพียงยีนเดียว คือ ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 7 และ 21 ตรวจสอบพบยีน *gus* เพียงยีนเดียว จำนวน 16 ต้น (88.89 เปอร์เซ็นต์) และ 15 ต้น (100 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

กลุ่มที่ 3 ตรวจสอบพบยีน *gus* หรือ *EPSPs* อย่างใดอย่างหนึ่ง คือ ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 19 ตรวจสอบพบยีน *gus* เพียงยีนเดียว จำนวน 1 ต้น (33.33 เปอร์เซ็นต์) ตรวจสอบพบยีน *EPSPs* เพียงยีนเดียว จำนวน 2 ต้น (66.67 เปอร์เซ็นต์)

กลุ่มที่ 4 ตรวจสอบพบทั้งยีน *gus* และ *EPSPs* คือ ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 10 11 14 16 และ 20 โดยที่ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 10 ตรวจสอบพบยีน *gus* และ *EPSPs* จำนวน 2 ต้น (15.38 เปอร์เซ็นต์) ส่วนต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 11 ตรวจพบทั้งสองยีนจำนวน 2 ต้น (18.18 เปอร์เซ็นต์) ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 14 ตรวจพบยีนจำนวน 4 ต้น (100 เปอร์เซ็นต์) ต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 16 ตรวจพบยีนจำนวน 4 ต้น (57.14 เปอร์เซ็นต์) และต้น T_2 ที่พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 20 ตรวจพบยีนจำนวน 8 ต้น (100 เปอร์เซ็นต์)

จากการสุ่มตรวจการแสดงออกของยีน *gus* แบบถาวรด้วยวิธี GUS histochemical assay ของต้น T_2 ในกลุ่มที่ 2 พบว่า บริเวณที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนมีการกระจายตั้งแต่ติดสีเฉพาะบางส่วนถึงติดสีเข้มทั้งชิ้นส่วน (ภาพที่ 17) ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการกระจายตัวของเซลล์ที่มียีน *gus* ในเนื้อเยื่อไม่สม่ำเสมอ ทำให้มีการแสดงออกของยีนเฉพาะเซลล์ที่ได้รับยีนเท่านั้น

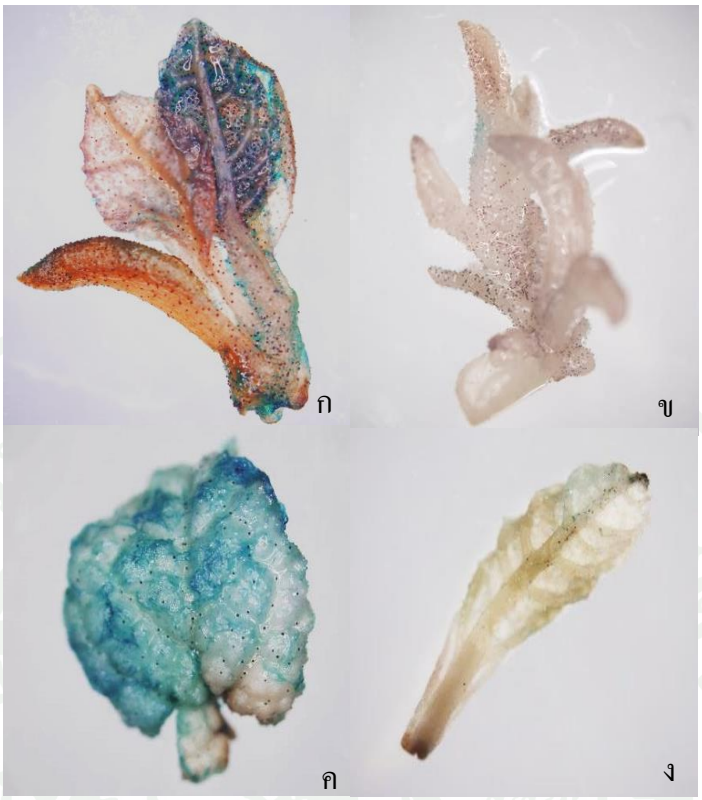
จากการคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนซ้ำโดยการเพิ่มปริมาณยอด และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกซ้ำ แล้วตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยวิธี PCR พบว่ายังคงมีการกระจายตัวของยีนในแต่ละยอดที่เกิดขึ้นจากแต่ละสายต้นเดิม ซึ่งแสดงว่าเนื้อเยื่อเกิดการ escape ดังนั้นจึงเลือกสายต้นที่มีการถ่ายทอดยีนคงที่ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีความคงตัวของยีนสูง มีแนวโน้มในการถ่ายทอดได้สูง ซึ่งได้แก่สายต้น T_0 ที่ 14 และสายต้น T_0 ที่ 20 ซึ่งมีจำนวนต้น T_2 จำนวน 4 และ 8 ต้น ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 จำนวนต้นสักที่เกิดขึ้นใหม่จากการชักนำในรุ่น T_1 และ T_2 และการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในรุ่น T_2 ด้วยเทคนิค PCR

หมายเลขต้นเดิม (T_0)	ต้นที่เกิดขึ้นใหม่รุ่นที่ 1 (T_1)	ต้นที่เกิดขึ้นใหม่รุ่นที่ 2 (T_2)	ต้น T_2 ที่พบการมีอยู่ของยีน		
			gus	*EPSPs*	*gus+EPSPs*
1	5	17	0	0	0
2	4	13	0	0	0
4	2	ปนเปื้อน/ตาย	-	-	-
5	ตาย	-	-	-	-
6	ตาย	-	-	-	-
7	5	18	16 (88.89%)	0	0
8	ตาย	-	-	-	-
9	2	ตาย	-	-	-
10	4	13	8 (61.54%)	2 (15.38%)	2 (15.38%)
11	4	11	11 (100%)	2 (18.18%)	2 (18.18%)
12	ปนเปื้อน/ตาย	-	-	-	-
13	ปนเปื้อน/ตาย	-	-	-	-
14	2	4	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
15	ตาย	-	-	-	-
16	2	7	4 (57.14%)	6 (85.71%)	4 (57.14%)
17	2	แคระแกร็น	-	-	-
18	4	ตาย	-	-	-
19	2	3	1 (33.33%)	2 (66.67%)	0
20	2	8	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
21	6	15	15 (100%)	0	0
22	2	แคระแกร็น	-	-	-
23	4	ปนเปื้อน/ตาย	-	-	-
25	3	ตาย	-	-	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีน *gus* แบบถาวรของชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นสักรุ่น T_2 ที่เจริญบนอาหารคัดเลือก เมื่อตรวจด้วยวิธี GUS histochemical assay

ก, ข, ชิ้นส่วนยอดสักที่ได้รับการถ่ายยีน

ค, ง ชิ้นส่วนใบสักที่ได้รับการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* โดยเทคนิค dot blot hybridization

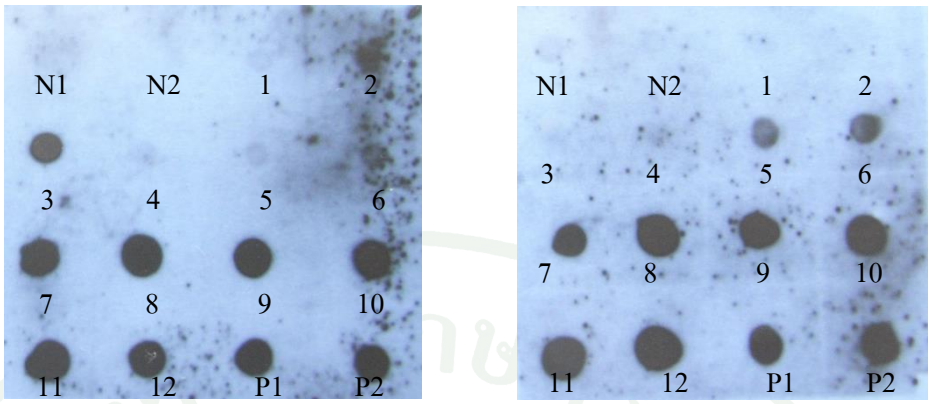
คัดเลือกต้น T_2 ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนที่ตรวจพบการคงอยู่ของทั้งสองยีนด้วยเทคนิค PCR จากการทดลองที่ 6 คือต้นกลุ่มที่ 4 ที่มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนจาก T_0 มายัง T_2 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่สายต้น T_0 ที่ 14 และสายต้น T_0 ที่ 20 ซึ่งมีจำนวนต้น T_2 จำนวน 4 และ 8 ต้น ตามลำดับ มาตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของยีนอีกครั้งโดยเทคนิค dot blot hybridization ซึ่งการตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจากต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเป็น positive control โดยหยดดีเอ็นเอของต้นสักปริมาณ 2 ไมโครกรัม บนแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* และ *EPSPs* ติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin (DIG) ตรวจสอบผลโดยดูจากสัญญาณบนแผ่นฟิล์ม x-ray หากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอสักและดีเอ็นเอตรวจสอบจะให้ผลเป็นสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม

จากการทดลองพบว่ามีสัญญาณสีดำปรากฏบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* ในต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 12 ต้น และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน และพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบการมีอยู่ของยีน (ภาพที่ 18) แสดงให้เห็นว่ามีการรวมตัวของยีน *gus* ในจีโนมของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนทุกต้นที่ทดสอบ โดยต้นที่ 1 4 และ 5 ตรวจพบสัญญาณสีดำที่จางมาก ส่วนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* พบการเกิดสัญญาณสีดำปรากฏในต้นที่ 5 – 12 ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน และพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ในขณะที่ต้นสักต้นที่ 1 – 4 ไม่พบสัญญาณสีดำปรากฏ ซึ่งอาจเกิดจากการไม่มียีน *EPSPs* อยู่ในต้นที่ทดสอบ หรืออาจเนื่องจากปัญหาของการเกิด chimera คือมียีน *EPSPs* กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ ทำให้ปริมาณของยีนที่มีอยู่ภายในจีโนมไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบ หรือตัวอย่างใบที่นำมาตรวจสอบเจริญมาจากเซลล์ที่ไม่มียีน *EPSPs* ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบซ้ำในขั้นตอนต่อไป

จากการทดลองนี้ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR แสดงให้เห็นว่ามีการรวมตัวของยีน *gus* และ *EPSPs* กับจีโนมของต้นสัก แต่ยังพบการเกิด chimera ดังนั้นจึงนำต้นสักจำนวน 12 ต้นไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันผลการถ่ายยีนซ้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก ข



ภาพที่ 18 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* (ก) และยีน *EPSPs* (ข) ในต้นสักรุ่นที่ 2 (T_2) ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค dot blot hybridization

N1 ดีเอ็นเอจากต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

N2 น้ำกลั่น

1 – 4 ดีเอ็นเอจากต้นสักรุ่นที่ T_2 ที่ได้มาจากต้น T_0 ต้นที่ 14

5 – 12 ดีเอ็นเอจากต้นสักรุ่นที่ T_2 ที่ได้มาจากต้น T_0 ต้น 20

P1 พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (positive control)

P2 ดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (positive control)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นต้นแบบ

จากการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในต้นสักที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีน *gus* และ *EPSPs* ด้วยเทคนิค PCR (การทดลองที่ 5.1) และ dot blot hybridization (การทดลองที่ 5.2) พบว่ามีต้นสักจำนวน 12 ต้น ที่ตรวจพบการคงอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* นำต้นดังกล่าวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้เกิดการสร้างรากและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากนั้นนำต้นสักทั้งหมดย้ายปลูกในกระถาง ปลูกในโรงเรือนชีวนิรภัย โดยใช้วัสดุปลูกเป็นดินผสม และทราย ในอัตราส่วนที่เท่ากัน วางเลี้ยงในที่ร่มและคลุมถุงเพื่อลดการคายน้ำเป็นระยะเวลา 1 เดือน จึงเปิดถุง และอนุบาลต้นอ่อนเป็นระยะเวลา 1 เดือน (ภาพที่ 19) พบว่า มีต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรอดชีวิตจำนวน 8 ต้น (66.67 เปอร์เซ็นต์) คือต้น T_2 หมายเลข 3 และ 4 จากต้น T_0 ต้นที่ 14 และต้น T_2 หมายเลข 7 8 9 10 11 และ 12 จากต้น T_0 ต้นที่ 20 ส่วนต้นสักที่เหลือจำนวน 4 ต้น ตายระหว่างการย้ายปลูก ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการต้นอ่อนในระยะแรกมีลักษณะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* และ *EPSPs* ทำโดยนำใบอ่อนต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน และต้นสักปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนเป็นระยะเวลา 2 เดือน ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 8 ต้น มาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วสังเคราะห์ first stranded cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นต้นแบบ และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าต้นที่ 4 และต้นที่ 7 – 12 มีรูปแบบของ ผลิตภัณฑ์ PCR เหมือนกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วมีขนาดประมาณ 919 คู่เบส ส่วนการแสดงออกของยีน *EPSPs* นั้น พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของต้นที่ 7 8 9 และ 10 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ซึ่งมีขนาดตรงกันกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นต้นแบบในการตรวจสอบยีน *EPSPs* ในขณะที่ชุดควบคุมต่างๆ คือต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และน้ำกลั่นนั้นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งสอง ส่วนยีน *Tg-NDPK* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาในต้นสัก ซึ่งใช้เป็น internal control พบว่ามีการแสดงออกของยีน *Tg-NDPK* ในทุกต้นที่ทดสอบ (ภาพที่ 20)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองนี้พบว่ามีการรวมตัวของยีน *gus* กับจีโนมต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ต้นที่ 4 11 และ 12 และมีการรวมตัวของยีน *gus* และยีน *EPSPs* กับจีโนมต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ต้นที่ 7 – 10 แสดงให้เห็นว่า การถ่ายยีนมีความคงตัวสามารถแสดงออกได้ในระดับการลอกรหัสของยีน (transcription) หรือระดับอาร์เอ็นเอ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR ดังนั้นจึงนำต้นที่ 7 – 10 ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 19 ต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ

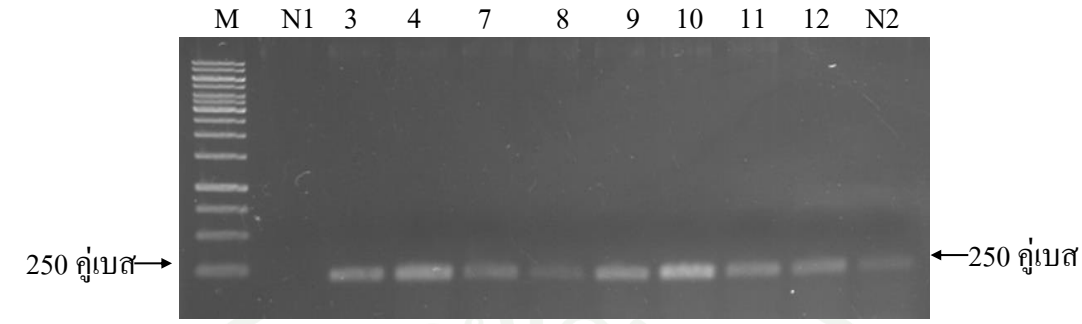
ก ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 เดือน

ข ต้นสักที่ปลูกในสภาพเรือนเพาะชำเป็นระยะเวลา 1 เดือน

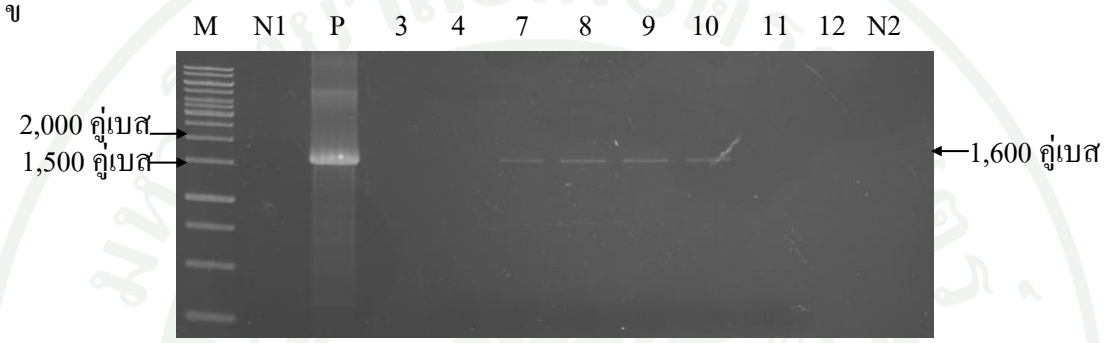
ค ต้นสักที่ปลูกในสภาพเรือนเพาะชำเป็นระยะเวลา 2 เดือน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

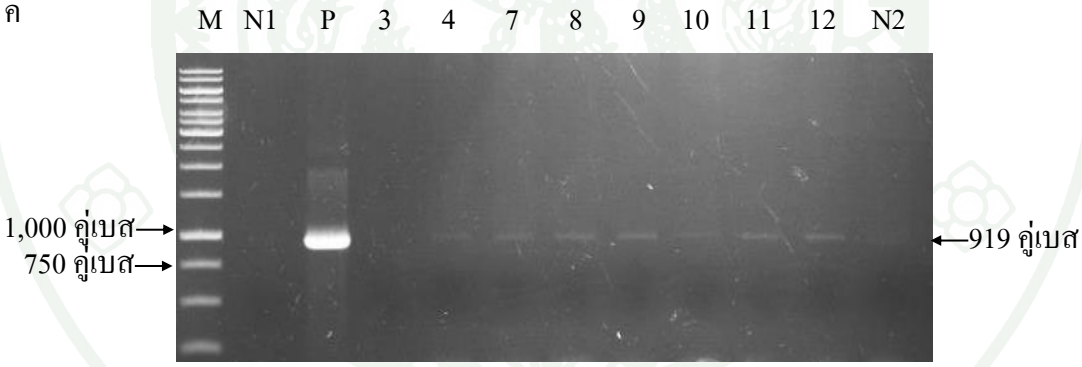
ก



ข



ค



ภาพที่ 20 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Tg-NDPK* (ก) ยีน *EPSPs* (ข) และยีน *gus* (ค) ในต้นสักรุ่น T_2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นต้นแบบ

M เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas, USA)

N1 น้ำกลั่น

N2 ดีเอ็นเอจากต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

3, 4 ดีเอ็นเอจากต้นสักรุ่น T_2 ของต้น 14

7 - 12 ดีเอ็นเอจากต้นสักรุ่น T_2 ของต้น 20

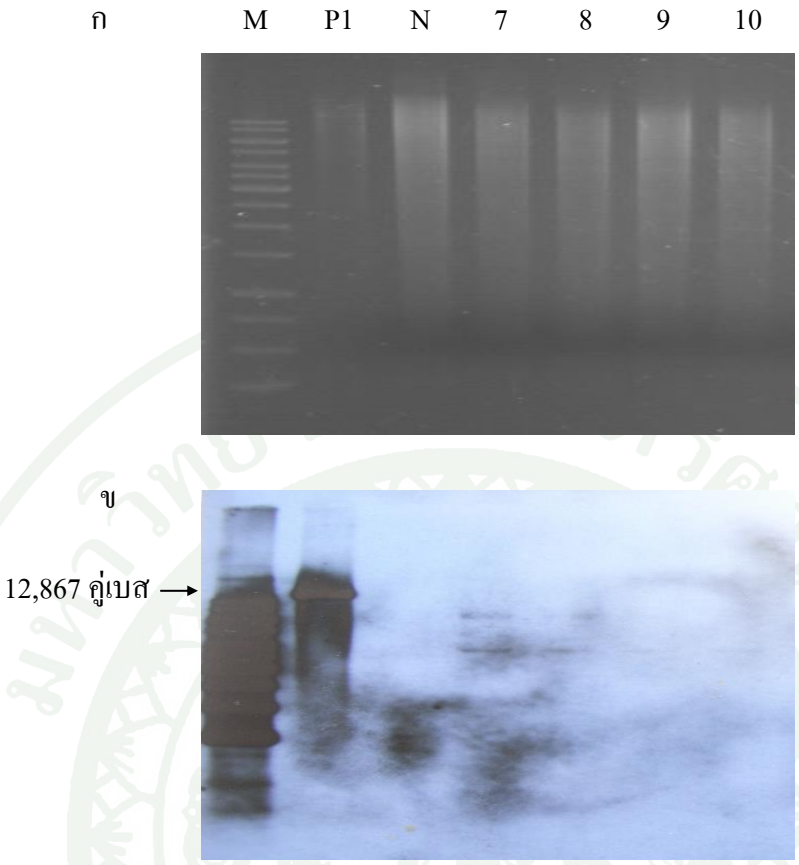
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *EPSPs* โดยเทคนิค Southern blot hybridization

ตรวจสอบการเข้ารวมตัวของยีน *EPSPs* กับจีโนมของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern blot hybridization เพื่อยืนยันผลการคงอยู่ของยีน และตรวจสอบจำนวนชุดของยีนที่เข้าไปรวมตัวกับจีโนมของต้นสัก โดยเลือกตรวจสอบในต้นสักรุ่น T_2 ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR dot blot hybridization และ PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นต้นแบบ จำนวน 4 ต้น คือต้นหมายเลข 7 8 9 และ 10 (โดยต้นสักทั้ง 4 ต้นนี้พัฒนามาจากต้น T_0 ต้นที่ 20) นำดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีนที่ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนเป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยใช้ดีเอ็นเอประมาณ 50 ไมโครกรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 1 ตำแหน่งบน T-DNA ของพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 แต่ไม่มีตำแหน่งจดจำบนชิ้นส่วนของยีน *EPSPs* จากนั้นแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน และไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะกับยีน *EPSPs* ตรวจสอบผลโดยดูจากแถบสัญญาณสีดำที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม x-ray

จากผลการ hybridization พบว่ามีแถบสัญญาณสีดำปรากฏบนแผ่นฟิล์ม โดยต้นสักต้นที่ 7 และ 8 ตรวจสอบพบแถบสัญญาณสีดำจำนวน 2 แถบ ส่วนต้นสักต้นที่ 9 และ 10 ตรวจสอบพบแถบสัญญาณสีดำจำนวน 1 แถบ แต่สัญญาณสีดำที่เกิดขึ้นมีสีจางยังไม่ชัดเจน ในขณะที่ต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่มีสัญญาณสีดำปรากฏ (ภาพที่ 21) แสดงว่าต้นสักต้นที่ 7 และ 8 มีจำนวนชุดของยีน *EPSPs* ที่เท่ากันจำนวน 2 ชุด และชิ้นส่วนของยีนอาจแทรกเข้าไปในจีโนมพืชที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน ทำให้ขนาดของดีเอ็นเอที่ตรวจพบชิ้นส่วนของยีน *EPSPs* อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าต้นสักทั้งสองต้นนี้อาจมีการพัฒนามาจากเซลล์เริ่มต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเซลล์เดียวกัน ส่วนต้นที่ 9 และ 10 มีจำนวนยีน 1 ชุด จากสัญญาณที่ปรากฏ แต่สัญญาณจางซึ่งอาจเกิดจากลักษณะ chimera ใบที่นำมาตรวจสอบอาจมีเซลล์ที่มีชิ้นส่วนของเซลล์ที่มียีนอยู่น้อย จึงให้สัญญาณไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงนำต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ทั้ง 4 ต้น คือ ต้นที่ 7 8 9 และ 10 ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *EPSPs* กับจีโนมของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิค Southern blot hybridization

ก ดีเอ็นเอจากใบต้นสักที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ข ตรวจสอบการแทรกตัวของยีนด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

M เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas, USA)

P1 พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม

N ดีเอ็นเอจากใบสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

7 – 10 ดีเอ็นเอจากใบสักที่ได้รับการถ่ายยีน ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 6 การตรวจสอบความทนทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท และการแสดงออกของยีน *EPSPs* ในต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ

6.1 การตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทในต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ

การตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทในต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน *EPSPs* เปรียบเทียบกับต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยฉีดพ่นไกลโฟเสทความเข้มข้น 3.6 กรัมต่อลิตรไปยังใบ 1 ใบจากใบคู่แรกนับจากยอดของต้นสักต้นที่ 7 8 9 และ 10 และต้นปกติที่ปลูกในสภาพโรงเรือนชีวนิรภัยเป็นระยะเวลา 5 เดือน (ภาพที่ 22) พบว่า หลังจากฉีดพ่นสารไกลโฟเสทเป็นระยะเวลา 3 วัน ในต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ใบที่ได้รับสารไกลโฟเสทเริ่มแสดงอาการใบเหลือง เหี่ยว ส่วนต้นที่ 7 มีลักษณะขอบใบม้วน ใบเริ่มเหลือง และต้นที่ 8 แสดงอาการใบเหลือง และเหี่ยวบริเวณกลางใบ ในขณะที่ต้นที่ 9 และต้นที่ 10 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น

ภายหลังการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ใบของต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีอาการเหี่ยว โดยเริ่มที่ส่วนปลายของใบและกระจายทั่วบริเวณใบที่ได้รับสาร ยอดเริ่มแสดงอาการเหี่ยว ส่วนต้นที่ 7 มีลักษณะขอบใบม้วนมากขึ้น ใบเหี่ยว และยอดบางส่วนเริ่มเหี่ยว ส่วนใบของต้นที่ 8 มีลักษณะเหี่ยวแพร่กระจายออกไปจากบริเวณกลางใบ ยอดเริ่มเหี่ยว เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนในต้นที่ 9 และ 10 พบว่า ใบมีลักษณะปกติ แต่ส่วนยอดเริ่มแสดงอาการเหี่ยว มีสีน้ำตาลเกิดขึ้น

เมื่อตรวจสอบลักษณะของต้นสักหลังเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นที่ 7 มีการสร้างยอดใหม่ขึ้นที่บริเวณตาใกล้ยอดเดิมที่เหี่ยวตายไป ส่วนต้นที่ 8 ใบที่ได้รับการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทมีลักษณะเหี่ยว หลุดร่วง และยอดมีสีน้ำตาล เหี่ยว ส่วนต้นที่ 9 และ 10 พบว่าส่วนยอดมีสีน้ำตาล เหี่ยว และเริ่มมีตายอดเกิดขึ้น ในขณะที่ใบที่ได้รับการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทยังคงมีลักษณะปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้น	ระยะเวลาหลังการฉีดพ่นสารไกลโฟเสท (วัน)			
	1	3	7	14
ปกติ				
7				
8				
9				
10				

ภาพที่ 22 ลักษณะใบสักหลังได้รับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 3.6 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และ *EPSPs* ในต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ

หลังจากฉีดพ่นสารไกลโฟเสทกับต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 4 ต้น เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่ามีการสร้างยอดใหม่บริเวณตาใกล้ยอดเดิมที่เหี่ยวไป ตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* ซึ่งเก็บตัวอย่างจากทุกใบของทุกต้น โดยตัดชิ้นส่วนจากบริเวณต่างๆ ของใบ แล้วนำตัวอย่างมารวมกัน นำไปสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า จากการตรวจสอบใบจากต้นที่ 7 จำนวน 10 ใบและใบจากต้นที่ 8 จำนวน 13 ใบ ไม่พบการคงอยู่ของทั้งยีน *gus* และยีน *EPSPs* ส่วนต้นที่ 9 จากการตรวจสอบจำนวน 10 ใบ พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *gus* ในตัวอย่างจำนวน 2 ใบ ซึ่งเป็นใบที่มีลักษณะด่าง มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับใบจากต้นปกติ (ภาพที่ 23) แต่ไม่พบยีน *EPSPs* และต้นที่ 10 ตรวจพบการคงอยู่ของยีน *gus* ในตัวอย่างจำนวน 5 ใบจากใบที่ตรวจสอบทั้งหมด 15 ใบ (ตารางที่ 20)

จากการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* ในต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนทดลอง (ตารางที่ 20) พบว่ามีต้นสัก 2 ต้น ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของทั้งสองยีน (ต้นที่ 7 และ 8) ส่วนอีก 2 ต้น (ต้นที่ 9 และ 10) มียีน *gus* เพียงยีนเดียว โดยมีการกระจายของยีน และสามารถตรวจพบยีนได้เพียงบางใบเท่านั้น แสดงว่าจากการถ่ายยีนในต้นสักครั้งนี้ไม่ได้เกิดขึ้นในทุกเซลล์ ทำให้ต้นที่ได้มีลักษณะ chimera จึงนำตัวอย่างแต่ละส่วนของใบจากต้นที่ 9 และ 10 มาตรวจสอบการกระจายของยีน *gus* ซ้ำอีกครั้ง ด้วยเทคนิค PCR โดยแยกสกัดตัวอย่างจากแต่ละจุดของใบที่ตรวจพบยีน *gus* ใบละ 5 – 8 ตัวอย่าง (ขึ้นกับขนาดใบ) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ทุกจุดของใบจากต้นที่ 9 ส่วนใบที่ 3 และ 4 ของต้นที่ 10 มีบางส่วนของใบที่ไม่พบการคงอยู่ของยีน *gus* (ตารางที่ 21)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 ผลการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิค PCR ของใบจากต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ต้นที่ 7 8 9 และ 10 ภายหลังการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทเป็นระยะเวลา 1 เดือน (+ คือพบแถบดีเอ็นเอ - คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ และ ND คือไม่มีตัวอย่างทดสอบ)

ต้นที่	ยีน	ใบของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
7	*Gus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
	EPSPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
8	*Gus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
	EPSPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
9	*Gus*	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
	EPSPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
10	*Gus*	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	EPSPs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 21 ผลการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค PCR กับชิ้นส่วนต่างๆ ของใบจากต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 ต้นที่ 9 และต้นที่ 10 ซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามียีน *gus* (+ คือพบแถบดีเอ็นเอ - คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ และ ND คือไม่มีตัวอย่างทดสอบ)

ต้นที่	ใบที่	ชิ้นส่วนของใบที่ตรวจสอบ							
		1	2	3	4	5	6	7	8
9	1	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
	2	+	+	+	+	+	+	ND	ND
10	2	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
	3	+	+	+	+	-	ND	ND	ND
	4	+	+	+	-	-	ND	ND	ND
	14	+	+	+	+	+	+	+	ND
	15	+	+	+	+	+	+	+	+

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 23 ลักษณะใบจากยอดที่เจริญใหม่ของต้นสักภายหลังได้รับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (ซ้าย) กับใบปกติของต้นสักที่ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (ขวา)

จากการตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทในต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน *EPSPs* หลังย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนชีวนิรภัย พบว่าต้นสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนและผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในระดับโมเลกุลแล้วนั้น เกิดความเสียหายเมื่อได้รับสารไกลโฟเสท แต่สามารถซ่อมแซมเจริญเติบโตได้ในภายหลัง ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจาก ความเข้มข้นของไกลโฟเสทระดับแนะนำที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษกับต้นสักในระดับที่ทำให้ต้นสักตายได้อย่างสมบูรณ์ ต้นสักจึงสามารถพัฒนาต่อไปได้

เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR ในต้นสักที่เจริญเติบโตภายหลังการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทเป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อยืนยันอีกครั้ง พบว่าไม่มีการตรวจพบการคงอยู่ของยีน *EPSPs* ในเนื้อเยื่อสักทุกต้นที่ทดสอบ แต่มีต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 2 ต้น คือ ต้นที่ 9 และต้นที่ 10 ที่สามารถตรวจพบการคงอยู่ของยีน *gus* ได้ แต่พบเพียงบางใบ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนของยีนอาจมีการสูญหายไปในระหว่างการเจริญเติบโตของต้นสัก โดยลักษณะการกระจายตัวของยีน *gus* ที่ตรวจสอบพบ แสดงว่าต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีน และพัฒนา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาเป็นต้นที่สมบูรณ์ในรุ่น T_2 นั้นยังมีลักษณะเป็น chimera เนื่องจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอยู่หลายเซลล์ มีบางเซลล์ได้รับการถ่ายยีน บางเซลล์ไม่ได้รับการถ่ายยีน จึงทำให้มีการกระจายของยีนไปได้ทุกส่วนของต้น เช่นส่วนของใบที่พัฒนามาจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน การเกิด chimera จะไม่คงที่ ขณะที่ต้นพืชมีการพัฒนาสร้างใบ และยอดใหม่ อาจทำให้ส่วนที่เจริญขึ้นใหม่เป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน หรือได้รับการถ่ายยีน

จากการถ่ายยีนเข้าต้นสักในครั้งนี้ พบว่ามีปัญหาการเกิด chimera ซึ่งสามารถพบได้บ่อยครั้งในการถ่ายยีนโดยใช้ชิ้นส่วนข้อ หรือปลายยอด ทำให้การถ่ายยีนมีความสำเร็จต่ำ ทั้งนี้มีหลายงานวิจัยที่รายงานการลดการเกิด chimera เช่นการถ่ายยีนในกล้วย (Tripathi *et al*., 2005) ซึ่งรายงานว่า การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารคัดเลือกและย้ายเนื้อเยื่อไปยังอาหารใหม่หลายๆ ครั้ง เป็นการกำจัดยอดที่เกิดจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเป็นการเปิดโอกาสให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการพัฒนา เช่นเดียวกับการถ่ายยีนไปยังชิ้นส่วนข้อของมัลเบอรี่ (Chitra *et al*., 2014) ที่พบว่า การย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 5 ครั้ง สามารถกำจัดยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ เช่นการเพิ่มความเข้มข้นของสารคัดเลือก การเติมอาหารเหลวที่มีสารคัดเลือกเพื่อให้ชิ้นส่วนสามารถสัมผัสสารคัดเลือกได้ทุกส่วน ดังนั้นการถ่ายยีนในพืชที่มีข้อจำกัดเรื่องการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส เช่นต้นสัก จึงจำเป็นต้องหาวิธีแก้ปัญหาการเกิด chimera เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีน และพัฒนาต้นที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างสมบูรณ์ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก พบว่า สักทุกสายต้นที่ทดสอบมีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงไม่แตกต่างกัน โดยฐานใบสักสายต้น 22C53 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี แต่ไม่สามารถสร้างยอดใหม่จากแคลลัสได้ ส่วนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากข้อสักสายต้น 22C53 พบว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และยอดที่ได้สามารถเกิดรากได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การทดสอบสารปฏิชีวนะ และสารคัดเลือกที่ใช้ในการถ่ายยีน พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของสักบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และการใช้สารไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมด โดยที่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน และจากการทดสอบสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อสัก และประสิทธิภาพของ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* พบว่าการใช้ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 300 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อสักได้ทั้งหมด โดยที่ฐานใบยังสามารถสร้างแคลลัสได้ดี และข้อยังแตกยอดใหม่ได้ไม่แตกต่างกับการไม่ใช้ cefotaxime

3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะได้ทดสอบ 6 ปัจจัย คือ สายพันธุ์เชื้อ *A. tumefaciens* ความเข้มข้นของเชื้อ ชิ้นส่วนพืช การสร้างบาดแผล ระยะเวลา inoculation และ co-cultivation จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่า การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีค่า OD_{600}=1 เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนข้อที่สร้างบาดแผลโดยการ sonication นาน 10 วินาที จากนั้นปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง และ co-cultivation เป็นระยะเวลา 3 วัน เป็นวิธีการถ่ายยีนในสักที่มีประสิทธิภาพสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล นำไปถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนข้อที่สร้างบาดแผลโดยการ sonication นาน 10 วินาที จากนั้นปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง และ co-cultivation เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วจึงเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกและกำจัดเชื้อ คืออาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวน 27 ต้นที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก แต่มีเพียง 23 ต้นที่มียีน *gus* และยีน *EPSPs* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

5. การถ่ายทอดของยีนในรุ่นถัดไป โดยการเพิ่มปริมาณยอดของสักสายต้นที่เจริญบนอาหารคัดเลือก และมียีน *gus* และยีน *EPSPs* จำนวน 23 ต้น ทำโดยเพาะเลี้ยงยอดสักดังกล่าวบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 169 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหาร 2 ครั้ง เพื่อสร้างต้นสักรุ่น T_2 แล้วจึงตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในต้นสักรุ่น T_2 จำนวน 109 ต้น โดยเทคนิค PCR, dot blot hybridization, PCR ที่ใช้ first stranded cDNA เป็นต้นแบบ และ Southern blot hybridization พบว่ามีต้นสักรุ่น T_2 จำนวน 4 ต้นที่ได้รับการถ่ายทอดของยีน *gus* และยีน *EPSPs*

6. การตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพเรือนเพาะชำ โดยการฉีดพ่นสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 3.6 กรัมต่อลิตร ไปยังใบของต้นสักที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_2 อายุ 5 เดือน จำนวน 4 ต้น เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีต้นสัก 2 ต้น ที่มีส่วนยอด และใบที่ได้รับสารไกลโฟเสทแสดงอาการเหี่ยวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลุดร่วง และมีต้นสัก 2 ต้น ที่ส่วนยอดแสดงอาการเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่ใบที่ได้รับสารไกลโฟเสทไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR ในใบทุกใบของแต่ละต้น ซึ่งผลการทดลองนี้พบว่ามียีน *gus* ที่บางใบของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 2 ต้น แต่ไม่พบยีน *EPSPs* ซึ่งอาจเกิดจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีลักษณะเป็น chimera ซึ่งการเกิดลักษณะ chimera อาจส่งผลต่อการตรวจการมีอยู่ของชิ้นส่วนของยีน *EPSPs* ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ทศพล พรพรหม. 2545. **สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 274 น.

รักชนก โคโต. 2549. **การถ่ายยีน *CPACO antisense* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 152 น.

รังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2531. **สารกำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช เล่ม 1: พื้นฐานการเลือกทำลาย**. จงเจริญการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 386 น.

ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2535. ความทนทานและความต้านทานของพืชต่อสารกำจัดวัชพืช. **วารสารวิทยาศาสตร์** 10: 47-50.

สมหวัง หวังเศรษฐกุล. 2540. **การเพิ่มปริมาณกล้าสักจากเมล็ดพันธุกรรมดีโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์, กรุงเทพฯ. 97 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 282 น.

สุทัศน์ เดชวิสิทธิ์. 2536. **ไม้สักทอง การลงทุนปลูกไม้สักเพื่อการค้า**. สำนักพิมพ์ เท็คโทน่า แกรนดีส กรุ๊ฟ, นนทบุรี. 200 น.

อภิชาติ ขาวสะอาด. 2521. ลักษณะการเจริญเติบโตของไม้สักตามการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล. น. 1-12. *ใน* **รายงานผลงานวนวัฒนวิจัย**. ฝ่ายวนวัฒนวิจัย กองบำรุง กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

_____. 2535. การปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ไม้สัก. น. 80-82. *ใน* **สัมมนา 50 ปี สวนสักห้วยทาก**. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา. 133 น.

Abrie, A.L. and J. Van Staden. 2001. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. **Journal of Plant Growth Regulation** 33: 19-23.

Agostino, M. 2012. **Practical Bioinformatics**. Garland Science, New York. 394 p.

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

Akram, M. and F. Aftab. 2008. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. **Propagation of Ornamental Plants** 8: 72-75.

_____ . 2009. An efficient method for clonal propagation and *in vitro* establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). **Forestry Studies in China** 11: 105-110.

Aldrich, K.J. and C.A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using Klen*Taq*1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Molecular Biology Reporter** 11: 128-141.

Al-Khayri, J.M. 2011. Basal salt requirements differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** 7: 32-42.

Ambros, P.F., A.J.M. Matzke and M.A. Matzke. 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosome by *in situ* hybridization. **EMBO Journal** 5: 2037-2077.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aoki, T., A. Kamizawa and S. Ayabe. 2002. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicas* with reliable antibiotic selection. **Plant Cell Report** 21: 238-243.

Azania, C.A.M., L.R. Pinto, R.C. Adriano, D. Perecin and A.P. Azania. 2013. The use of glyphosate in sugarcane: a Brazilian experience. *In* A. Price, ed. **Herbicides - Current Research and Case Studies in use**. Available Source: http://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/the-use-of-glyphosate-in-sugarcane-a-brazilian-experience, May 13, 2014.

Bais, H.P., S.G. Sudha and G.A. Ravishankar. 2000. Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. **Journal of Plant Growth Regulation** 19: 238-248.

Bakshi, S., A. Sadhukhan, S. Mishra and L. Sahoo. 2011. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea *via* sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Report** 30: 2281-2292.

Beyer, E. M. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Plant Physiology** 58: 268-271.

Binns, A.B. and M.F. Thomashow. 1998. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Annual Review of Microbiology** 42: 575-606.

Boase, M.R., R.W. Harriman, F.D. Smith and S.C. Deroles. 2012. Herbicide-resistant, transgenic zonal pelargoniums produced by step-down glyphosate selection and plantlet recovery in the presence of aromatic amino acids. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant** 48: 313–323.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Boonkird, S. 1996. Flowering of Teak. **Natural History Bulletin of the Siam Society** 21: 69-76.

Catapan, E., M.F. Otuki and A.M. Viana. 2001. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany** 24: 25-34.

Castle, L., D. Siehl, R. Gorton, P. Patten, Y. Chen, S. Bertain, H. Cho, N. Duck, J. Wong, D. Liu and M. Lassner. 2004. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. **Science** 304: 1151-1154.

Cerda, F., F. Aquea, M. Gebauer, C. Medina and P. Arce-Johnson. 2002. Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 70: 251-257.

Cervera, M., J.A. Pina, J. Juarez, L. Navarro and L. Pena. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Report** 18: 271-278.

Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prasher. 1994. *Green fluorescent protein* as a marker for gene expression. **Science** 263: 802-805.

Chitra, D.S.V., B. Chinthapalli and G. Padmaja. 2014. Efficient regeneration system for genetic transformation of mulberry (*Morus indica* L. Cultivar S-36) using *in vitro* derived shoot meristems. **American Journal of Plant Sciences** 5: 1-6.

Christou, P., D.E. McCabe and W.F. Swain. 1988. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. **Plant Physiology** 87: 671-674.

Citovsky, V., M.L. Wong and P. Zambryski. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: Implications for the T-DNA transfer process. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 86: 1193-1197.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Comai, L., L.C. Sen and D.M. Stalker. 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. **Science** 221: 370-371.

Custis, I.S., J.B. Power, P. Hendden, D.A. Ward, A. Phillip, K.C. Lone and M.R. Davey. 1999. A stable transformation system for the ornamental plant *Datura meteloides.* **Plant Cell Report** 18: 554-560.

Dai, W., Z.M. Cheng and W. Sargent. 2003. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from *in vitro* leaf tissues. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant** 39: 6-11.

Davis, S.A. 2007. **Molecular characterisation and expression profiles of the *CP4 EPSPS* gene in field-tested transgenic onions (*Allium cepa* L.)**. M.S. Thesis, University of Canterbury.

De la Riva, G.A., J. González-Cabrera, R. Vázquez-Padrón and C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology** 1: 118-133.

Devi, Y.S., B.B. Mukherjee and S. Gupta. 1994. Rapid cloning of elite teak (*Tectona grandis* Linn.) by *in vitro* multiple shoots production. **Indian Journal of Experimental Biology** 32: 668-671.

Dixon, R. and N. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell** 7: 1085-1097.

Duan, H.Y., X.S Ding, J.Y. Song, Y.L. He and Y.Q. Zhou. 2013. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Achyranthes bidentata* using cotton *EREBP* gene. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 56: 349-356.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Duke, S.O. and S.B. Powles. 2009. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioForum** 12: 346-357.

Dutt, M., Z.T. Li, S.A. Dhekney and D.J. Gray. 2007. Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* Thompson Seedless *via Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Report** 26: 2101-2110.

Erisen, S., M. Yorgancilar, E. Atalay, M. Babaoglu and A. Duran. 2010. Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketae* in Turkey. **Electronic Journal of Biotechnology** 13: 1-7.

Franz, J., M. Mao and J. Sikorski. 1997. **Glyphosate: A Unique Global Herbicide**. Washington DC, American Chemical Society. 653 p.

Funke, T., H. Han, M.L. Healy-Fried, M. Fischer and E. Schonbrunn. 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 103:13010-13015.

Gangopadhyay, G., S. Basu Gangopadhyay, R. Poddar, S. Gupta and K.K. Mukherjee. 2003. Micropropagation of *Tectona grandis*: assessment of genetic fidelity. **Biologia Plantarum** 46: 459-461.

Gheysen, G., R. Villarroel and M. van Montagu. 1989. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. **Genes Development** 5: 287-297.

Giridhar, P., B.O. Reddy and G.A. Ravishankar. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. **Current Science** 81:1166–1170.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gorlach, J., J. Schmid and N. Amrhein. 1993. Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. II. Chorismate synthase. **Plant Molecular Biology** 23: 707-716.

Gu, X.F., H. Meng, G. Qi and J.R. Zhang. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 94: 23-32.

Gupta, P.K., A.L. Nadgir, A.F. Mascarenhas and V. Jaganathan. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. **Plant Science Letters** 17: 259–268.

Gyves, E.M., L.I. Royani and E. Rugini. 2007. Efficient method of micropropagation and *in vitro* rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large scale industrial plantations. **Annals of Forest Science** 64: 73–78.

_____. and E. Rugini. 2009. Teak. pp. 321-340. *In* C. Kole and T. C. Hall Jr., eds. **Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species**. Blackwell Publishing Ltd.

Hansen, G. and M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science** 4: 226-231.

Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology** 35: 205-218.

Hoffmann, L.V. and M.L.S. Vieira. 2000. *In vitro* response and *Agrobacterium* susceptibility of two cultivars of *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 733-742.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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*. **Nature Biotechnology** 14: 745-750.

Jansen, C. 2000. Glufosinate metabolism in excised shoots and leaves of twenty plant species. **Weed Science** 48: 319-326.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric gene in plant: the *gus* gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter** 5: 378-405.

Jube, S. and D. Borthakur. 2009. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the tree-legume *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 96: 325–333.

Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta** 126: 105-110.

Khatri, J.H., M.U. Kukdia and R.R. Singh. 2001. Micropropagation of teak (*Tectona grandis* L.). **Indian Journal of Forestry** 24: 368–371.

Khemkladngoen, N., J.A. Cartagena and K. Fukui. 2011. Physical wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of juvenile cotyledons of a biodiesel-producing plant, *Jatropha curcas* L. **Plant Biotechnology Reports** 5: 235–243.

Kishore, G. and D. Shah. 1988. Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides. **Annual Review in Biochemistry** 57: 627-663.

Koronfel, M. 1998. Effects of the antibiotics kanamycin, cefotaxime and carbenicillin on the differentiation of flax hypocotyls. **Arab Journal of Biotechnology** 1: 93 – 98.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Krishnapillay, B. 2000. Silviculture and management of teak plantations. **Unasylva** 51: 14-19.

Kumar, V., G. Parvatam and G.A. Ravishankar. 2009. $AgNO_3$-a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electronic Journal of Biotechnology** 12: 1-15.

Laksana, C. 2011. **Simple and rapid RNA extraction from young and mature leave of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Special problem, Kasetsart University. 27 p.

Lakhsmi-Sita G, G.L. Sreenivas and S. Bhattacharya. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree. **Plant Tissue Culture and Biotechnology** 4: 189-195.

Lee, B.K., S.H. Yu, Y.H. Kim, B.O. Ahn, H.S. Hur, S.C. Lee, Z. Zhang and J.Y. Lee. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of perilla (*Perilla frutescens*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 83: 51-58.

Lehman, C.W., J.K. Trautman and D. Carroll. 1994. Illegitimate recombination in *Xenopus*: characterisation of end-joined junctions. **Nucleic Acid Research** 22: 434-442.

Li, Z.N., F. Fang, G.F. Liu and M.Z. Bao. 2007. Stable *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). **Plant Cell Report** 26: 641–650.

Leupin, R.E., M. Leupin, C. Ehret, K.H. Erismann and B.Witholt. 2000. Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vetiver from Java. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 115-123.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society** 30: 421-427.

Maniatis, T., E.F Fritsch and J. Sambrook. 1982. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Cold Spring Harbor Laboratory. Spring Harbor, New York.

Mannan, A., T.N. Syed and B. Mirza. 2009. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. **Pakistan Journal of Botany** 41: 3239-3246.

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 Science** 46: 217-223.

_____ . 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 Reports** 6: 454-457.

Matthysse, A.G. 1986. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Critical Reviews in Microbiology** 13: 281-307.

McCown, B.H. and J.C. Sellmer. 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture, pp. 4 – 16. *In* J.M. Bonga and D.J. Durzan eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Volume 1. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Mittal, P., S.S. Gosal, A. Senger and P. Kumar. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. **Physiology and Molecular Biology of Plants** 15: 257-265.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.

Muruganantham, M., A. Ganapathi, N. Selvaraj, R. Prem Anand, A. Vasudevan, and G. Vengadesan. 2002. Adenine sulphate and L-glutamine enhance multiple shoot induction from cotyledon explants of melon (*Cucumis melo* L. cv. Swarna). **Cucurbit Genetics Cooperative Report** 25: 22-24.

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 Physiology** 76: 571-574.

Naaz, A., A. Shahzad and A. Mohammad. 2014. Effect of adenine sulphate interaction on growth and development of shoot regeneration and inhibition of shoot tip necrosis under *in vitro* condition in adult *Syzygium cumini* L. - a multipurpose tree. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 173: 90-102.

Nitsch, J.P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. **Science** 163: 85-87.

Nor Aini, A.S., B.L. Goh and R. Ridzuan. 2009. The effects of different indole-3-butyric acid (IBA) concentrations, two light regimes of *in vitro* rooting and acclimatization of *in vitro* teak (*Tectona grandis* L.f) plantlets. **African Journal of Biotechnology** 8: 6158-6161.

Norwati, A., R. Abdullah, H. Mohd Rosli and B. Norlia. 2003. Genetic transformation of *cry 1Ab* gene into teak. **Molecular Plant Breeding** 1: 53-57.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____ , B. Norlia, H. Mohd Rosli, M. Norwati and R. Abdullah. 2011. Development of transgenic teak (*Tectona grandis*) expressing a *cry1Ab* gene for control of the skeletoniser. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 19: 149-156.

_____ , A. Ruslan, M. Norwati and B. Norlia. 2007. A biolistic approach for the transfer and expression of *uidA* gene in nodal segments of teak (*Tectona grandis*). **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 15: 115-120.

Oliveira, M.L.P.-d., V.J. Febres, M.G.C. Costa, G.A. Moore and W.C. Otoni. 2008. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus *via* sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Report** 28: 387-395.

Pena, L., R.M. Perez, M. Cervera, J.A. Juarez and L. Navarro. 2004. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany** 94: 67-74.

Piqueras, A., N. Alburquerque and K.M. Folta. 2010. Explants used in the generation of transgenic plants, pp. 31 – 56. *In* C. Kole, C.H. Michler, A.G. Abbott and T.C. Hall eds. **Transgenic Crop Plants volume 1: Principle and Development**. Springer, New York.

Pitzschke, A. and H. Hirt. 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. **EMBO Journal** 29: 1021-1032.

Pline-Srnic, W. 2006. Physiological mechanisms of glyphosate resistance. **Weed Technology** 20: 290-300.

Puchta, H. 1998. Repair of genomic double-strand breaks in somatic cells by one-side invasion of homologous sequences. **Plant Journal** 13: 331-339.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rijuta, K., S. Macahuri, R. Kushalker and M. Sharon. 1996. Direct and indirect somatic embroygenesis in teak (*Tectona grandis* L.f.). **Current Science** 71: 712-715.

Rippert, P., C. Scimemi, M. Dubald and M. Matringe. 2004. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology** 134: 92-100.

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 Journal of Biotechnology** 7: 247-253.

Sahai, A., A. Shahzad and M. Anis. 2010. High frequency plant production *via* shoot organogenesis and somatic embryogenesis from callus in *Tylophora indica*, an endangered plant species. **Turkish Journal of Botany** 34: 11-20.

Salman, H., A. Abu-Arish, S. Oliel, A. Loyter, J. Klafter, R. Granel, and M. Elbaum. 2005. Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules. **Biophysic Jounal** 89: 2134-2145.

Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany** 50: 199-204.

Seo, H.Y., Y.J. Kim, T.I. Park, H.S. Kim, S.J. Yun, K.H. Park, M.K. Oh, M.Y. Choi, C.H. Paik, Y.S. Lee and Y.E. Choi. 2007. High frequency plant regeneration *via* adventitious shoot formation from deembryonated cotyledon explants of *Sesamum indicum* L. ***In Vitro*** **Cellular and Developmental Biology-Plant** 43: 209-214.

Shah, D., R. Horsch,.H. Klee, G. Kishore, J. Winter, N. Tumer, C. Hironaka, P. Sanders, C. Gasser, S. Aykent, N. Siegel, S. Rogers and R. Fraley. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science** 233: 478-481.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sharma, S., P.K. Rana, A.K. Mandal and S.A. Ansari. 2000. Promotion of shoot multiplication by vipul (triacontanol) and adventitious rhizogenesis by rice bran extract in *Tectona grandis.* **Journal of Plant Biology** 27: 265–269.

Shirin, F., P.K. Rana and A.K. Mandal. 2005. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal of Forest Research** 10: 465-469.

Sirisom, Y. and S. Te-chato. 2012. The effect of peptone and silver nitrate on *in vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. **Journal of Agricultural Technology** 8: 1509-1516.

Siwach, P., S. Chanana, A.R. Gill, P. Dhanda, J. Rani, K. Sharma, H. Rani and D. Kumar. 2012. Effects of adenine sulphate, glutamine and casein hydrolysate on *in vitro* shoot multiplication and rooting of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **African Journal of Biotechnology** 11: 15852-15862.

Song, K.J., S.B. Jin and K.Z. Riu. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cultures in 'Miyagawa Wase' satsuma mandarin (*Citrus unshiu marc*). **Acta Horticulturae** 738: 265-271.

Sridevi, V., P. Giridhar, P.S. Simmi and G.A. Ravishankar. 2010. Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants with collar region from *in vitro* seedlings of *Coffea canephora* Pierre ex. Frohner cv. C 3 R and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 101: 339-347.

Stalker, D.M., K.E. McBride, and L. Malyj. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. **Science** 242: 419-423.

Steephen, M., S. Nagarajan and D. Ganesh. 2010. Phloroglucinol and silver nitrate enhances axillary shoot proliferation in nodal explants of *Vitex negundo* L. –an aromatic medicinal plant. **Iranian Journal of Biotechnology** 8: 82-89.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strader, L.C., E.R. Beisner and B. Bartel. 2009. Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. **Plant Cell** 21: 3585-3590.

Tawfik, A.A. and G.Noga. 2001. Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explants of cumin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 66: 141-147.

Teixeira da Silva, J.A. and S. Fukai. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. **Journal of Applied Horticulture** 3: 3-12.

Thakur, A.K., S. Sharma and D.K. Srivastava. 2005. Plant regeneration and genetic transformation studies in petiole tissue of Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.). **Current Science** 89: 664-668.

Tinland, B., F. Schoumacher, V. Gloeckler, A.M.A. Bravo and B. Hohn. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. **EMBO Journal** 14: 3585-3595.

Tiwari, S.K., K.P. Tiwari and E.A. Siril. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 71: 1-6.

Trick, H.N. and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports** 17: 482-488.

Tripathi, L., J.N. Tripathi and J. d'A. Hughes. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of plantain (*Musa* spp.) cultivar Agbagba. **African Journal of Biotechnology** 4: 1378-1383.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tzfira, T. and V. Citovsky. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 17:147-154.

Vardja, R. and T. Vardja. 2001. The effect of cytokinin type and concentration and the number of subculture on the multiplication rate of some decorative plants. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Biology and Ecology** 50: 22-32.

Wakasa, K., H. Hasegawa, H. Nemoto, F. Matsuda, H. Miyazawa, Y. Tozawa, K. Morino, A. Komatsu, T. Yamada, T. Terakawa and H. Miyagawa. 2006. High level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. **Journal of Experimental Botany** 57: 3069-3078.

Wang, K., S.E. Stachel, B. Timmerman, M.M. Van and P. Zambryski. 1987. Site-specific nick occurs within the 25 bp transfer promoting border sequence following induction of *vir* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. **Science** 235: 587-591.

Ward, E. and W. Barnes. 1988. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 50 end of T-strand DNA. **Science** 242: 927-930.

Wells, B.H. and A.P. Appleby. 1992. Lactofen increasing glyphosate stimulated shikimate production in little mallow (*Malva parviflora*). **Weed Science** 40: 171-173.

White, K.J. 1991. **Teak: some aspects of research and development.** FAO Regional office for Asia and the Pacific (RAPA), Bangkok. 53 p.

White, P.R. 1963. **The cultivation of animal and plant cells.** Ronald Press, New York. 239 p.

Widiyanto, S.N., D.S. Diningrat and A. Sukmawan. 2004. Strain specificity in *Agrobacterium*-mediated transformation of teak shoots. ***In* The 15th TSB Annual Meeting Chiang Mai–Thailand**, February 3-6.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____ , D. Erytrina and H. Ahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. **Acta Horticulturae** 692: 153-158.

_____ , A. Pancoro and D. Sasmitamihardja. 1998. **Genetic variability analyses of various elite teak clones using Random Amplified Polymorphic DNA markers**. Technical Report. The Institute for Research, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia.

_____ , A. Sukmawan, N. Haro and H. Rahmania. 2009. Transient expression of *β-glucuronidase* reporter gene in *Agrobacterium*-inoculated shoots of various teak clones. **African Journal of Biotechnology** 8: 2143-2150.

Wise, A.A., Z. Liu and A.N. Binns. 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *In* K.Wang ed. **Methods in Molecular Biology 343: *Agrobacterium* protocol** 1: 43–53. Human Press Inc., New Jersey.

Yepes, L.M and H.S. Aldwinckle. 1994. Factors that effect the leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 37: 257-269.

Yevtushenko, D.P. and S. Misra. 2010. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L. x *P. maximowiczii* A. Henry. **Plant Cell Report** 29: 211-221.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yu, T.A., S.D. Yeh and J.S. Yang. 2001. Effect of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Botanical Bulletin of Academia Sinica** 42: 281-286.

Yunaini, L. and S.N. Widiyanto. 2003. Somatic embryogenesis from callus culture of teak (*Tectona grandis* L.f.) derived from leaf explants. ***In Vitro*** **Biology Congress, SIVB**. Portland, OR, USA., May 31-June.

Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. *Cre/lox* mediated gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants**. Theoretical and Applied Genetics** 107: 1157-1168.

Zhao, Z.Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer and D. Pierce. 2000. *Agrobacterium* mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology** 44: 789-798.

Zhao, Z.Y., W. Gu, T. Cai, L. Tagliani, D. Hondred, D. Bond, S. Schroeder, M. Rudert and D. Pierce. 2001. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Molecular Breeding** 8: 323-333.

Zia, M., Z.F. Rizvi, R.U. Rehman and M.F. Chaudhary. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): some conditions standardization**. Pakistan Journal of Botany** 42: 2269-2279.

Zuraida, A.R., K. Rahiniza, A.S. Zulkifli, Z. Alizah, Z. Zamri and A. Aziz. 2013. Hygromycin as selective marker in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *indica* rice MR 219. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science** 41: 71-79.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ธาตุอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สูตรอาหาร		
	MS	WPM	SH
Macronutrients			
NH_4NO_3	1,650.00	400.00	-
$NH_4H_2PO_4$	-	-	300.00
KNO_3	1,900.00	-	2500.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	96.40	200.00
$Ca(NO_3)_24H_2O$	-	556.00	-
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	370.00	400.00
KH_2PO_4	170.00	170.00	-
Micronutrients			
H_3BO_3	6.20	6.20	5.00
$MnSO_4.H_2O$	22.30	16.90	10.00
$ZnSO_4.7H_2O$	10.93	8.60	1.00
KI	0.83	-	1.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.10
K_2SO_4	-	990.00	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.25	0.20
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	0.10
Fe-EDTA solution			
Na_2-EDTA	37.25	37.25	20.00
$FeSO_4.7H_20$	27.85	27.85	15.00
Organic compounds			
Glycine	2.00	2.00	-
Nicotinic acid	0.50	0.50	5.00
Pyridoxine HCl	0.50	0.50	0.50
Thiamine HCl	0.10	1.00	5.00
Myo-inositol	100.00	100.00	100.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ธาตุอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สูตรอาหาร		
	MS	WPM	SH
Others			
Sucrose	30,000.00	20,000.00	25,000.00
Agar	7,500.00	7,500.00	7,500.00
pH	5.75-5.80	5.75-5.80	5.75-5.80

หมายเหตุ MS : Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1960)
WPM : Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980)
SH : Schenk and Hildebrandt (Schenk and Hildebrandt, 1972)

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani Media (LB) (Maniatis *et al.*, 1982) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *A. tumefaciens*

สารเคมี	กรัมต่อลิตร
Bacto tryptone	10.0
Bacto yeast extract	5.0
NaCl	10.0
Agar	15.0
pH 7.0	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวเยาวพรรณ สนธิกุล
เกิดวันที่	27 ตุลาคม พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(ผลิตกรรมชีวภาพ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (พ.ศ.2547) วท.ม.(พืชศาสตร์) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (พ.ศ. 2550)
ผลงานดีเด่น	รางวัลผู้นำเสนอภาคบรรยายดีเด่น ในการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ครั้งที่ 4
ทุนการศึกษา	1) โครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ 2) บัณฑิตผู้ช่วยวิจัยศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์