



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

สาขา

พืชไร่นา

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)
via *Agrobacterium*

نامผู้วิจัย นายกุลชาติ นาคจันทิก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์บุบผา คงสมัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.)
โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) via
Agrobacterium

โดย

นายกุลชาติ นาคจันทิก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2554

กุลชาติ นาคจันทิก 2554: การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทเข้าสู่มัน
สำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ปริญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D. 65 หน้า

การถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*, Crantz.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304-EPSPS ที่มียีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (*aroA*) และยีนรายงานผล *gus* โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ เวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) 15 30 45 และ 60 นาที กับการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับเนื้อเยื่อ (co-cultivation) 1 3 และ 5 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่า วิธีการที่ให้ผลดีที่สุดคือ การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะและกระตุ้นเชื้อโดยใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ร่วมกับการปลูกเชื่อนาน 60 นาที และเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อทุกชิ้นได้รับการถ่ายยีนและมีค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีน้ำเงินจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 7 วัน สูงสุด 9 คะแนนจาก 10 คะแนน ส่วนแคลลัสของมันสำปะหลังที่ปลูกเชื่อนาน 30 นาที และเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ทำให้เนื้อเยื่อทุกชิ้นได้รับการถ่ายยีนและมีค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีน้ำเงินสูงสุด 5 คะแนนจาก 10 คะแนน หลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 14 วัน และหลังจากคัดเลือkbนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบแคลลัสจำนวน 8 ชิ้น สามารถเจริญเติบโตได้ และเมื่อตรวจสอบโดยวิธีพีซีอาร์ และSouthern PCR hybridization พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *aroA* จำนวน 4 แคลลัส

Kulachart Nakchantuk 2011: Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) via *Agrobacterium*. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 65 pages.

The parameters for *Agrobacterium*-mediated gene transferred into cassava, *Manihot esculenta* Crantz, were optimized. *Agrobacterium* strain EHA105, harboring the pCAM1304-EPSPS containing glyphosate resistance gene (*aroA*) and *gus* reporter gene was used. Parameters were concurrently studied including 1) inoculation periods of 15, 30, 45 and 60 minutes, 2) co-cultivation periods of 1, 3 and 5 days. The GUS histochemical assay was performed on each explants after co-cultivation to determine transient expression of *gus* gene. The results demonstrated that the best result was obtained by using *A. tumefaciens* strain EHA105 activated by 100 mM acetosyringone, 60 min inoculation period and 5 days co-cultivation period. The results after transformation for 7 days using such technique revealed that all tissue pieces were transformed and the GUS histochemical assay showed the highest score of 9 from 10 scores. Whereas the inoculation time of 30 min combined with 3 days co-cultivation time gave 100% of transformed tissue with the highest GUS histochemical assay scored of 5 from 10 scores after 14 days of transformation. After selection on selective medium containing 5 μ M glyphosate, 8 of putative transformed calli were obtained. However, the result of PCR analysis and Southern PCR hybridization for the transgenes revealed that 4 out of 8 calli contained *aroA* gene.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สนธิชัย จันทน์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ดร. บุปผา คงสมัย กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสมอมา ทั้งในด้านการเรียน
การค้นคว้าวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและคณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา
คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน รวมทั้งครูอาจารย์ทั้งใน
อดีตและปัจจุบันที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษาและขอขอบคุณพี่
เพื่อนและน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ อีกทั้งเป็น
กำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม สำหรับสถานที่และ
อุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณพ่อประยงค์ คุณแม่จิราณี นาคจันทิก พี่ต๋น และญาติทุกคน
ในครอบครัว ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จ
คล่องตัวดีตลอดมา

กุลชาติ นาคจันทิก

มีนาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	45
ภาคผนวก	54
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ออกจากแคลลัสมันสำปะหลังเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรชักนำแคลลัสของมันสำปะหลังร่วมกับเดิมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโคร โมลล์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 7 วัน เป็นเวลา 14 วัน	30
2	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการปลูกเชื้อ (inoculation) กับการเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ที่มีต่อการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน <i>gus</i>	36
ตารางผนวกที่		
1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog	55
2	องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani media (LB) สำหรับเลี้ยงเชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
3	องค์ประกอบของอาหาร SOB สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับเพื่อทำ competent cell ของ <i>Escherichia coli</i> และเลี้ยงเชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
4	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ด้วยวิธี GUS Histochemical assay	57
5	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมของพืชโดยดัดแปลงจากวิธี CTAB	58
6	การเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction ; PCR) ของยีน <i>aroA</i>	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
7	การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10X สำหรับเทคนิค agarose gel electrophoresis	60
8	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization และ Southern blot hybridization	60

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้กำจัดเชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ในแคลลัสของมันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ	30
2	ผลของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อความมีชีวิตของ แคลลัสมันสำปะหลัง เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส	33
3	transient expression ของยีน <i>gus</i> ในแคลลัสมันสำปะหลัง ที่ปลูกเชื้อและเพาะเลี้ยง ร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังการถ่ายยีน 7 วัน	37
4	transient expression ของยีน <i>gus</i> ในแคลลัสมันสำปะหลัง ที่ปลูกเชื้อและเพาะเลี้ยง ร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังการถ่ายยีน 14 วัน	38
5	ลักษณะแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>aroA</i> ในแคลลัสมันสำปะหลังที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก โดยการใช้วิธี พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)	40
6	ลักษณะแถบสีดำนที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่ได้จากปฏิกิริยา Southern PCR hybridization กับดีเอ็นเอของแคลลัสที่รอดชีวิตได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ยีน <i>aroA</i> เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ	41
7	ลักษณะจุดสีดำนที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่ได้จากปฏิกิริยา dot blot hybridization กับดีเอ็นเอของแคลลัสที่รอดชีวิตได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ยีน <i>aroA</i> เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ	42
ภาพผนวกที่		
1	แผนที่ของพลาสมิด pCAM1304-EPSPS	61

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

<i>aroA</i>	=	glyphosate herbicide resistant gene
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EPSPS	=	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
GUS	=	β -glucuronidase
PCR	=	polymerase chain reaction
RNase	=	ribonuclease
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
T-DNA	=	transfer DNA

การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) via *Agrobacterium*

คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ ในปัจจุบันมีการเพิ่มการใช้มันสำปะหลังในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนและอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่น ๆ ทำให้แนวโน้มการปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทยเพิ่มขึ้น ในปี 2552 เนื้อที่เก็บเกี่ยวมันสำปะหลังในประเทศไทยอยู่ที่ 8,292,146 ไร่ (นิรนาม, 2552) แต่ปัญหาในการปลูกมันสำปะหลังนอกจากสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน โรคและแมลงที่เข้าทำลายแล้ว วัชพืชก็ถือเป็นอุปสรรคสำคัญมีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของมันสำปะหลัง ถ้าการควบคุมวัชพืชในแปลงมันสำปะหลังไม่ดีจะทำให้ผลผลิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (Leihner, 2002) โดยเกษตรกรส่วนใหญ่จะใช้สารกำจัดวัชพืชจำพวกไม่เลือกทำลาย เช่น ไกลโฟเสต และกลูโฟซิเนต ในการแก้ปัญหาวัชพืช ซึ่งการทำงานของไกลโฟเสตนั้น จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้าง aromatic amino acid ในพืช (นิรนาม, 2549) และปัญหาของมันสำปะหลังเกี่ยวกับการใช้สารกำจัดวัชพืชนี้คือ ต้นมันสำปะหลังที่ยังเล็กจะตายหรือชะงักการเจริญเติบโตเมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืช ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มันสำปะหลังมีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช จะช่วยทำให้การกำจัดวัชพืชของเกษตรกรมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และอาจทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

วัตถุประสงค์

พัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะสำหรับการ
ถ่ายยีน



การตรวจเอกสาร

มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (cassava) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz. จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นพืชที่มีประโยชน์อย่างมากทางด้านอาหารมนุษย์ เช่นนำหัวสดมาประกอบอาหารต่าง ๆ หรือแปรรูปเป็นแป้งมันเพื่อนำมาปรุงอาหาร ทางด้านอาหารสัตว์ ใช้ในรูปมันอัดเม็ด และมันเส้น เนื่องจากมีราคาต่ำกว่าธัญพืช ทางด้านอุตสาหกรรม เช่น การทำสารที่มีคุณสมบัติเป็นกาว ใช้ในอุตสาหกรรมไม้อัด ก่ออิฐ กระจก ยางอะซีโตน กลูโคส พงชูรส เบียร์ วุ้นเส้น ยา ในปัจจุบันได้มีแนวคิดที่จะส่งเสริมมันสำปะหลังในแง่พลังงานทดแทนโดยทำเป็นแอลกอฮอล์ เพื่อเป็นเชื้อเพลิงใช้กับรถยนต์ (दनัย, 2537) ซึ่งมันสำปะหลังทนความแล้งได้ดี สามารถขึ้นได้ในที่มีฝนเฉลี่ยปีละ 500-1,500 มม. หรือมากกว่า แต่ไม่สามารถทนต่อสภาพน้ำท่วมขังได้ ดินที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังควรเป็นดินทราย หรือดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำดี และมีความอุดมสมบูรณ์พอสมควร มันสำปะหลังทนต่อสภาพดินกรด pH ต่ำถึง 4.5 ได้ดี แต่ในดินที่มี pH มากกว่า 8 ก็ไม่เหมาะสมสำหรับปลูกมันสำปะหลัง ในปี 2550-2552 ประเทศไทยมีเนื้อที่เก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง คือ 7,338,809 7,397,098 และ 8,292,146 ไร่ ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนผลผลิตต่อไร่ คือ 3,668 3,401 และ 3,628 กิโลกรัม ตามลำดับ (นิรนาม, 2552)

ลักษณะพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลังทั้งพันธุ์ทั่วไปและพันธุ์ป่า มีจำนวนโครโมโซม $2n = 36$ โดยปกติเป็นพวก allotetraploid ซึ่งในระยะ meiosis จะสร้าง 18 bivalents (दनัย, 2537) โดยธรรมชาติมันสำปะหลังมีทั้งการผสมข้าม (cross pollination) และการผสมตัวเอง (self pollination) โอกาสที่เกิดการผสมข้ามจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับลักษณะนิสัยของการออกดอกของแต่ละพันธุ์ มันสำปะหลังที่มีการผสมข้ามโดยธรรมชาติ เมล็ดที่เกิดจากการผสมแต่ละเมล็ดจะมี genotype ที่แตกต่างกัน ลูกผสมชั่วที่ 1 (F1) ที่ได้จึงมีการกระจายตัวเกิดความแปรปรวนในลักษณะต่าง ๆ ทั้งทางด้านรูปทรง ลักษณะต้น ผลผลิต และดัชนีการเก็บเกี่ยว (harvest index) แต่ลูกที่ได้จากการผสมตัวเองนั้นจะมีอิทธิพลของ inbreeding depression ทำให้ลูกที่ได้อ่อนแอ ผลผลิตต่ำ ความสูงและความแข็งแรงลดลงอย่างมาก นอกจากนั้นยังทำให้บางต้นไม่สามารถผลิตดอกตัวผู้หรือดอกตัวเมีย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

มันสำปะหลัง “ห้วยบง 60” เป็นมันสำปะหลังที่พัฒนาขึ้นมา โดยความร่วมมือของ นักวิชาการจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย พันธุ์นี้เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ระยอง 5 และเกษตรศาสตร์ 50 ตั้งแต่ พ.ศ. 2534 ทำการ คัดเลือกและทดสอบ ตั้งแต่ พ.ศ. 2535-2544 มีคุณสมบัติเด่นที่ให้ผลผลิตสูงและเชื้อแป้งในหัวสูง ด้วย มีชื่อเดิมคือ สายพันธุ์ MKUC 34-114-206 และได้รับพระราชทานชื่อพันธุ์ว่า “ห้วยบง 60” จาก สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี องค์พระราชูปถัมภ์ของมูลนิธิฯ คำว่า “ห้วยบง” แสดงถึง ศูนย์วิจัยและพัฒนามันสำปะหลังของมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ตั้งอยู่ที่ตำบลห้วยบง อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา และ “60” แสดงถึง ปีที่ครบรอบ 60 ปี ของการก่อตั้งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2546 (วิจารณ์, 2546)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนในพืชเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากทั้งในด้านการศึกษาเพื่อให้เกิดความ เข้าใจถึงกลไกการทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนการต่าง ๆ ทางชีววิทยา และเพื่อ ประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ในพืชชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถสร้างพืชพันธุ์ใหม่ให้ได้ลักษณะที่ดี ตามต้องการ โดยใช้ระยะเวลาอันสั้นและพืชต้นใหม่ยังคงลักษณะเดิมที่มีเอาไว้ โดยสามารถย้าย ยีนจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน (นิตยศรี และ สัมพันธ์, 2548) ซึ่งปัจจุบันการถ่ายยีนเข้าสู่พืชทำได้สำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด เช่น ออนซิเดียม (Liau *et al.*, 2003) มันสำปะหลัง (Taylor *et al.*, 2004) ข้าวฟ่าง (Gao *et al.*, 2005) และถั่วลิสง (Anuradha *et al.*, 2006) เป็นต้น

เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืช แบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ ๆ คือ

1. การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)

เป็นการส่งถ่ายยีนให้เซลล์พืชโดยส่งผ่านสารพันธุกรรมหรือการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช โดยไม่ต้องอาศัยพาหะ (vector) เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ เช่น การใช้แรงดัน การใช้กระแสไฟฟ้า การใช้สารเคมี หรือการใช้สภาวะทางกายภาพต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เป้าหมายได้ วิธีที่นิยมกันมาก ได้แก่ การถ่ายยีนโดยใช้ เครื่องยิงอนุภาค

(particle bombardment, gene gun, microprojectile bombardment) และการถ่ายยีนโดยวิธี electroporation (สนธิชัย และ เสริมศิริ, 2549)

2. การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้ในบริเวณที่มีบาดแผล ซึ่ง *Agrobacterium tumefaciens* เมื่อบุกรุกเข้าสู่พืชทำให้พืชเกิดเป็นปุ่มปม (tumour) เรียกว่า crown gall disease มีสาเหตุมาจากพลาสมิดที่พบใน *A. tumefaciens* เรียกว่า Tumour inducing plasmid (Ti plasmid) ซึ่งมีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายเข้าไปและแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของพืชอย่างถาวร เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า transfer DNA (T-DNA) ส่งผลให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ผิดปกติเกิดเป็นลักษณะปุ่มปม (สุรินทร์, 2545) โดย de la Riva *et al.* (1998) อธิบายว่ากระบวนการส่งถ่าย T-DNA จาก *A. tumefaciens* ไปยังเซลล์พืชขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ คือ 1) การเข้าไปยึดเกาะกับพืชบริเวณที่เกิดบาดแผล 2) การชักนำให้เกิดการทำงานของยีนในแบคทีเรีย 3) การผลิตสารประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการส่งถ่าย T-DNA และ 4) การแทรกตัวของ T-DNA ซึ่งมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินเข้าไปในจีโนมของพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ ซึ่งขอบเขตของ T-DNA ที่ถูกส่งถ่ายไปยังเซลล์พืชนั้นกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) จำนวน 25 คู่เบสทั้ง 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) โดยกระบวนการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีนที่เรียกว่า *virulence* อยู่ในส่วนของ Ti plasmid กระบวนการส่งถ่ายนี้จะถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบ phenolic จากพืช คือ acetosyringone (AS) หรือ α -hydroxyl-acetosyringone ซึ่งพืชสร้างและปลดปล่อยออกมาเมื่อพืชเกิดบาดแผล ดังนั้นต่อมานักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษากลไกการถ่ายยีนเหล่านี้ และพบว่าสามารถดัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออกแล้วใส่ยีนใหม่ที่เป็นประโยชน์แทนที่ยีนก่อโรคได้ เมื่อพืชถูกบุกรุกด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมนี้แล้วยีนที่เป็นประโยชน์ก็จะถูกถ่ายเข้าสู่พืชได้ (สนธิชัย และ เสริมศิริ, 2549)

กระบวนการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติระหว่างเชื้อกับพืชอาศัย โดยการถ่ายยีนวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษใด ๆ ที่มีราคาแพง จึงเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง (สนธิชัย และเสริมศิริ, 2549) แต่อาจมีข้อจำกัดในเรื่องของความจำเพาะเจาะจงของเชื้อกับพืชอาศัย (Finer and Finer, 2000) ความรุนแรงของเชื้อและวิธีการทำให้เกิดบาดแผลบริเวณเซลล์เป้าหมาย (สนธิชัย, 2543) การถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* นี้

แต่เดิมจะได้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น ซึ่งในธรรมชาติเชื้อ *A. tumefaciens* นี้ไม่สามารถเข้าบุกรุกในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ (Hooykass and Schilperoort, 1992) โดย Vasil (1994) ได้รายงานความสำเร็จการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวและธัญพืชโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* แต่พบว่ายังมีปัญหาเนื่องจากพืชเหล่านี้จะไม่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ เพราะไม่ได้เป็นพืชอาศัย แต่ในปัจจุบันการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ได้รับการพัฒนาจนประสบความสำเร็จทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้หลายชนิด ซึ่ง Smith and Hood (1995) ได้รายงานถึงการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterim* ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาโดยลำดับ โดยเริ่มจากการเลือกเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการถ่ายยีน เช่น เนื้อเยื่อเจริญ และการปรับสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* เช่น งานวิจัยของ Sheikholeslam and Weeks (1987) ได้เติมสาร acetosyringone ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อและระหว่างการพัฒนาเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ (Owens and Smigocki, 1988; Godwin *et al.*, 1991) เพื่อกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ใน Ti-plasmid ของเชื้อ *Agrobacterium* ให้ทำงานได้ดีขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

ความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น พันธุกรรมพืช เนื้อเยื่อของพืช อายุของเนื้อเยื่อพืช สายพันธุ์และความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ (inoculation period) ความเข้มข้นของสาร acetosyringone วิธีการทำบาดแผลบนเนื้อเยื่อพืช และระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม เป็นต้น (Jacobsen, 1993) ซึ่งในแต่ละส่วนมีรายละเอียดที่ควรพิจารณาดังนี้

1. พันธุกรรมพืช ชิ้นส่วนของพืช อายุของเนื้อเยื่อพืช และระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม

ในประเด็นพันธุกรรมพืชที่มีผลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้น เป็นประเด็นที่มีการกล่าวถึงกันค่อนข้างมาก ตัวอย่างเช่น การทดลองของ Saharan *et al.* (2004) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว 2 สายพันธุ์ คือ HKR-46 และ HKR-126 โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่บรรจุ พลาสมิด pCambia1301 เป็นพาหะมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าข้าวสายพันธุ์ HKR-126 มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ HKR-46 (44.4 และ 28.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ

การถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก นาน 4-6 สัปดาห์ พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสในข้าวสาลี พันธุ์ HKR-126 สูงถึง 52.6 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองของ Danilova and Dolgikh (2005) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวโพด 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ R91 และสายพันธุ์ลูกผสม A188xR91 โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pBI121 เป็นพาหะมียีน *nptII* เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินนั้น ภายหลังจากการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนนาน 1 เดือนพบว่าแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม A188xR91 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าข้าวโพดสายพันธุ์ R91 (4.7 และ 4.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

เนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนนั้น พืชแต่ละชนิดมีเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนแตกต่างกัน ซึ่งเนื้อเยื่อนิยมนำมาใช้ในการถ่ายยีนได้แก่ คัพพะอ่อน (immature embryo) แคลลัส เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด แผ่นใบ และราก เป็นต้น (Nandakumar *et al.*, 2004) เช่น การทดลองของ Somleva *et al.* (2002) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ไซมาติกเอมบริโอและแคลลัสของหญ้า switchgrass พบว่าการใช้ไซมาติกเอมบริโอเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายนั้นให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าการใช้แคลลัส และพบการพัฒนาของเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกด้วย แต่อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้เนื้อเยื่อที่มีชอกมูมหรือที่มีขนาดเล็กมาก เพราะวิธีการถ่ายยีนโดยวิธีนี้จำเป็นต้องทำบาดแผลให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมาย และต้องกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อภายหลังการถ่ายยีน เนื้อเยื่อขนาดเล็กทำให้เกิดการบอบช้ำได้ง่ายและเนื้อเยื่อที่มีชอกมูมมาก ทำให้การกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกในภายหลังทำได้ยากเช่นกัน (สนธิชัย และ เสริมศิริ, 2549)

นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนแล้ว อายุของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนก็มีผลด้วยเช่นกัน โดยการทดลองของ Yan *et al.* (2000) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อใบอ่อนของถั่วเหลืองที่มีอายุและขนาดต่าง ๆ พบว่าให้ประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีน *gus* ต่างกัน โดยเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อยและขนาดเล็กจะมีอัตราการมีชีวิตรอดและมีการแสดงออกของยีน *gus* ต่ำกว่าเนื้อเยื่อที่มีอายุมากและขนาดใหญ่กว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Alsheikh *et al.* (2002) พบว่าเนื้อเยื่อส่วนใบและก้านใบของสตรอเบอรี่ที่อายุต่างกันมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในการทดลองของ Anuradha *et al.* (2006) ถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เข้าสู่ถั่วลิสงโดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อของใบเลี้ยงที่มีอายุตั้งแต่ 1-8 วัน เพื่อศึกษาอายุของชิ้นส่วนพืชที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน พบว่าข้อใบเลี้ยงของถั่วลิสงที่มีอายุ 6 วัน มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกยีนรายงานผลสูงที่สุด

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* คือ วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายให้เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน โดยการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูง Potrykus (1990a และ b) รายงานว่าการเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีความแตกต่างจากพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากพืชใบเลี้ยงคู่เมื่อเกิดบาดแผลจะกระตุ้นให้มีการเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่เพื่อซ่อมแซมบริเวณที่เกิดบาดแผลได้ดี ทำให้ยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปมีโอกาสแทรกรวมกับจีโนมของพืชได้มากขึ้น แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะไม่มีการแบ่งเซลล์ใหม่บริเวณบาดแผล แต่ใช้วิธีการทำให้บริเวณที่เกิดบาดแผลเกิดการแข็งตัว (lignified) เพื่อลดการสูญเสียน้ำและเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชต่าง ๆ จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้พืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่ใช่พืชอาศัยของ *A. tumefaciens* และทำให้เชื้อเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ยาก

ดังนั้นการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ *A. tumefaciens* ควรต้องศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชนั้น ๆ ก่อน โดยเลือกเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ รวมทั้งศึกษาชนิดและสูตรของอาหารเพาะเลี้ยงที่สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชแบ่งเซลล์ในขณะที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* และศึกษาสูตรอาหารที่ชักนำให้เนื้อเยื่อเป้าหมายเกิดต้นใหม่ได้ดี (Hiei *et al.*, 1994)

2. สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens*

ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่าง ๆ นั้นสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้จัดเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการดัดแปลงสายพันธุ์ *A. tumefaciens* ให้สามารถบุกรุกเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ก็ตาม แต่ในพืชแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* แตกต่างกัน โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่รุนแรงมากนั้นอาจไม่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องจากยีน *vir* ของเชื้อจะมีความจำเพาะต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของเนื้อเยื่อพืช โดย *A. tumefaciens* แต่ละสายพันธุ์จะมีระบบของ *virulence* ที่ต่างกัน (รักชนก, 2549) ยกตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ EHA105 จัดเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงมาก (hypervirulence strain) ที่ได้รับการพัฒนามาจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่บรรจุ Ti-plasmid คือ pEHA105 โดยพัฒนามาจาก pTiBo542 Δ T-region ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิด succinamopine type (Hood *et al.*, 1993) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงและสามารถเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงคู่ได้หลากหลายชนิด (broad host range) โดยเฉพาะพืชในวงศ์ Solanaceae (solanaceous plant)

มีรายงานหลายฉบับได้ยืนยันผลดังกล่าว เช่น Cao *et al.* (1998) ได้เปรียบเทียบการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์คือ LBA4404 และ EHA105 ที่มี *gus-int* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่เบอร์รี่ (*Vaccinium* spp.) พบว่าสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ LBA4404 และในการทดลองของ Tsuyoshi *et al.* (2001) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ LBA4404 AGL-1 และ EHA105 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วชูกิ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ทำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* มากกว่าการใช้สายพันธุ์ LBA4404 เนื่องจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงเป็นพิเศษ (hypervirulent) ที่ถูกพัฒนาส่วนของ Ti-plasmid ให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยที่กว้างมากขึ้น และมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น ต่อมา Yong *et al.* (2006) ได้ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดและข้อของ *Melastoma malabathricum* และ *Tibouchina semidecandra* โดยใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ซึ่งประกอบด้วยยีน *mgfp5* เป็นยีนรายงานผล พบว่าสายพันธุ์ LBA4404 ให้ผลดีที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ *M. malabathricum* ส่วนสายพันธุ์ EHA105 มีความเหมาะสมกับ *T. semidecandra* และ Hankoua *et al.* (2006) ได้ทำการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังในแอฟริกา โดยชักนำยอดจาก friable embryogenic calli และ somatic embryos ได้ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 GV3101 และ LBA4404 พบว่าสายพันธุ์ GV3101 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนดีที่สุด

สำหรับในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวก็มีรายงานที่คล้ายคลึงกันเช่น Lee *et al.* (2006) ได้ทดสอบสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหญ้า orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) โดยเปรียบเทียบ 3 สายพันธุ์ คือ EHA101 GV3101 และ LBA4404 การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงที่สุดเท่ากับ 58.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถ่ายยีนโดยใช้สายพันธุ์ EHA101 รองลงมาคือ สายพันธุ์ GV3101 และ LBA4404 ตามลำดับ

ดังนั้นเพื่อให้การถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ให้ประสบความสำเร็จในพืชชนิดนั้น ๆ ในกรณีที่ไม่มีงานวิจัยมาก่อนควรทดสอบสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อพืชชนิดที่ถ่ายยีนนั้น ๆ

3. ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens*

ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดย สุมนา (2550) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่ญารูซี่ โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ กันโดยใช้ปริมาตรสารแขวนลอยเชื้อต่ออาหารเหลวสูตร MS ในช่วง 1:1 1:10 และ 1:20 พบว่าอัตราส่วน 1:10 ทำให้ได้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุด โดยเกิดจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 1.83 จุดต่อน้ำหนักแคลลัส 1 กรัม

อย่างไรก็ตาม Humara *et al.* (1999) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Pinus pinea* L. โดยใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ คือ ระดับที่มีค่า OD₆₀₀ ในช่วง 0.01-1.0 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 ทำให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด แต่ในทางตรงกันข้ามระดับความเข้มข้นของเชื้อที่สูงขึ้นนี้กลับทำให้เกิดยอดของเนื้อเยื่อพืชลดลงจาก 58 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งผลในลักษณะเดียวกันนี้พบในงานวิจัยของ Yan *et al.* (2000) ด้วยเช่นกัน โดยพบว่า ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ สูงขึ้นทำให้ความมีชีวิตของเนื้อเยื่อส่วนข้อของใบเลี้ยงของถั่วเหลืองลดลง

4. การเติมสาร acetosyringone

acetosyringone เป็นสารประกอบที่พืชสร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล สารชนิดนี้เป็นสารที่เชื้อ *A. tumefaciens* ต้องการเพื่อใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อปุ่มปม (Stachel *et al.*, 1985) สารนี้จะเข้าไปกระตุ้นการหลั่งของยีน *vir* ใน *A. tumefaciens* โดยทำงานร่วมกับ transmembrane receptor protein (Melchers *et al.*, 1989) แต่เนื่องจากในสภาพธรรมชาติพืชหลายชนิดไม่สามารถสร้างสารนี้ได้ปริมาณที่มากพอ โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่สามารถสร้างสาร acetosyringone ได้เองเมื่อเกิดบาดแผล ดังนั้นการเติมสาร acetosyringone ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ อาหารที่ใช้สำหรับการปลูกเชื้อ (inoculation) หรืออาหารที่ใช้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะกระตุ้นและเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนให้ดีขึ้น (นิรนาม, 2553)

5. ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ (inoculation)

การปลูกเชื้อเป็นขั้นตอนที่ช่วยทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* ยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืชได้ (Yong *et al.*, 2006) ซึ่ง Ke *et al.* (2002) รายงานว่าระยะเวลาในการปลูกเชื้อมีผลต่อการแสดงออกของยีน *gus* โดยทดลองปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pAL155/pAL156 ให้ต้นอ่อนของข้าวบาร์เลย์ ใช้ระยะเวลานาน 0.5 4 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง ทำให้ประสิทธิภาพส่งถ่ายยีนต่ำมาก และ Wu *et al.* (2003) ได้ปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ให้กับผักของข้าวสาลี เป็นเวลา 0 0.25 0.5 1 2 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมงเหมาะสมในการปลูกเชื้อมากที่สุด พบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานขึ้น แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานเกินไปจะส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดต้นของพืชลดลง ส่วนในการทดลองของ Almeida *et al.* (2003) ปลูกเชื้อให้ใบเลี้ยงส้ม ที่ระยะเวลา 20 นาที สามารถพบการแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด

6. ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ (co-cultivation)

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อนั้นในพืชแต่ละชนิดจะต่างกัน ช่วงเวลาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญในการช่วยทำให้เกิดกลไกการส่งถ่ายยีนจาก *A. tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืช (Yong *et al.*, 2006) โดยทั่วไปจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ ประมาณ 2-4 วัน Custis *et al.* (1999) รายงานว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อที่นานเกินไปจะทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* เจริญเติบโตคลุมเนื้อเยื่อพืชจนไม่สามารถกำจัดได้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อที่นานเกินไปอาจส่งผลการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อเกิดการ necrosis ได้ ซึ่งจากการทดลองของ Cervera *et al.* (1998) พบว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อที่นานขึ้นมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้นด้วย แต่ไม่ควรนานเกินไป ซึ่งจะส่งผลการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและลดประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดย Cao *et al.* (1998) กล่าวว่าปกติแล้วไม่แนะนำให้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อนานเกิน 4 วัน เพราะการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อพืชจะทำได้ยาก อาจส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตายได้

Lee *et al.* (2006) ได้ทดลองหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของหญ้า orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงที่สุดประมาณ 57.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระยะเวลา 5 1 และ 7 วัน พบว่าการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว เท่ากับ 48.9 40.2 และ 32.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่พืชจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีน และการบังคับให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช ขึ้นส่วนของพืชที่เหมาะสม อายุพืช สภาพแวดล้อมก่อนการคัดเลือก แสง แหล่งที่มาของชิ้นส่วน สภาพแวดล้อมสำหรับการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis หรือการพัฒนาเป็นต้น อาหาร วิธีการคัดเลือก สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ เป็นต้น (Jacobsen, 1993)

โปรโมเตอร์ ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene)

โปรโมเตอร์ (promoter)

โปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่ใช้กันมากคือ โปรโมเตอร์จากยีน nopaline synthase (nos promoter) ซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti และ โปรโมเตอร์จากไวรัสของกะหล่ำ (cauliflower mosaic virus; CaMV 35S promoter) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพและแสดงออกได้ในเซลล์พืชทุกประเภท จึงเป็นโปรโมเตอร์ที่นิยมนำมาใช้กันมากในการถ่ายยีนในพืช เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนหรืออาจใช้โปรโมเตอร์ที่มาจากพืชที่ต้องการทดสอบ เช่น Sairam *et al.* (2003) ใช้ พลาสมิด pMP90RK ที่บรรจุยีน *gfp* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์จากยีนแอกตินของข้าว (rice actin promoter) เพื่อถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของข้าวโพดโดยใช้ *A. tumefaciens* พบการแสดงออกของยีน *gfp* ได้ทั้งใบ เกสรตัวผู้ (anther) และละอองเรณู (pollen)

ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene)

เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกที่นิยมใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ ยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ยีน *neomycin phosphotransferase II (nptII)* เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin หรือยีน *aroA* เป็นยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช glyphosate (นุชจิรี, 2552)

ยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)*

เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside ที่มีคุณสมบัติในการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน เนื่องจากสารปฏิชีวนะ hygromycin จะไปขัดขวางการจดจำตำแหน่งของ aminoacyl tRNA และการเข้าเกาะที่ตำแหน่ง A-site ของไรโบโซมของพืช ดังนั้นการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin จะให้ผลที่แน่นอน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมดและไม่พบภาวะเผือก (albino) หรือได้ต้นถ่ายยีนที่เป็นหมัน (Hiei *et al.*, 1997) โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Potrykus and Spangenberg, 1995) เช่น รายงานของ Aldemita and Hodges (1996) คัดเลือกข้าว *japonica* และ *indica* ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าการเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration) ของต้นข้าวที่ไม่ได้รับสารปฏิชีวนะ hygromycin มีการแสดงออกของยีน *gus* น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น Komari *et al.* (1996) พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ลงในอาหาร regeneration ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย GUS histochemical assay แล้ว พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* 85 เปอร์เซ็นต์ และ Kondo *et al.* (2000) คัดเลือกเนื้อเยื่อกระเทียม (*Allium sativum* L.) ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ hygromycin ในแต่ละครั้งของการเปลี่ยนอาหาร ตั้งแต่ 10-40 มิลลิกรัมต่อลิตร

ยีน *neomycin phosphotransferase II (nptII)*

เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin neomycin geneticin และ paramomycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside ที่มีคุณสมบัติในการ

รบกวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้พืชไม่สามารถสร้างโปรตีนเพื่อนำมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ได้ จึงทำให้เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ตาย มีรายงานการนำสารปฏิชีวนะ kanamycin มาใช้เป็นสารคัดเลือกลงในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด เช่น การทดลองของกัญญา (2549) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกแคลลัสของ ถั่วสามตำที่ได้รับการถ่ายยีน *nptII* แต่ในการทดลองของ Aoki *et al.* (2002) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกถั่ว *Lotus japonicas* แต่พบว่ายังไม่เพียงพอที่จะทำให้เนื้อเยื่อตายหมด จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้แตกต่างกันนั้น เพราะพืชที่ใช้มีความแตกต่างกัน อีกทั้งเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีนก็แตกต่างกัน ทำให้ความทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้นั้นแตกต่างกัน

ยีน *aroA*

ไกลโคเฟสเฟต เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีการพัฒนาขึ้นมาในปี ค.ศ. 1972 โดย Franz แห่งบริษัทมอนซานโต้ สารในกลุ่มนี้เริ่มมีการนำเข้ามาใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs (5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวน (aromatic amino acid) ได้แก่ phenylalanine, tryptophan และ tyrosine

ไกลโคเฟสเฟตเป็นสารประเภทไม่เลือกทำลาย ที่มีกลไกหรือตำแหน่งของปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs ซึ่งจะไปยับยั้งเพียงตำแหน่งเดียวใน shikimate pathway โดยจะเปลี่ยน phosphoenolpyruvate (PEP) และ shikimate-3-phosphate ทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ EPSPs ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้ถูกควบคุมโดยนิวเคลียสในโมเลกุล แต่จะทำหน้าที่ในคลอโรพลาสต์ แม้ว่าจะทำปฏิกิริยาไซโทพลาซึมได้ (ทศพล, 2545)

ในปี พ.ศ. 2537 บริษัทมอนซานโต้ได้ทดลองผลิตพันธุ์ถั่วเหลือง (สายพันธุ์ 40-3-2) ที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโคเฟสเฟต โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคยิงพาหะ PV-GMGT04 ประกอบด้วยยีน *CP4EPSPS* 2 ชุด และยีนรายงานผล *gus* ถั่วเหลืองในชั่วที่ 2 คือ สายพันธุ์ 40-3-2 R2 แสดงความทนทานต่อสารไกลโคเฟสเฟตได้ดีและไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* หากนำพืช 40-3-2 R2 มาผสมพันธุ์กับถั่วเหลืองธรรมดาพบว่ายีน *CP4EPSPS* ถูกถ่ายทอดในรูปแบบยีนเด่นตามหลักการของ Mendel ผลการวิเคราะห์ด้วย Southern blot ในถั่วเหลืองสายพันธุ์นี้ พบว่า มียีน

CP4EPSPS เพียง 1 ชุด และไม่มียีน *gus* จากการวิเคราะห์ในเมล็ดพันธุ์และใบของพืชโดยใช้วิธี ELISA ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* หรือโปรตีน GUS และผลการผสมพันธุ์กับถั่วเหลือง พันธุ์อื่น ๆ และการวิเคราะห์ลูก พบว่ายีน CP4EPSPS มีความมั่นคงและถ่ายทอดในรูปแบบยีนเด่น (นิรนาม, 2549.)

Arnaud and Sailland (1998) ได้ทดลองถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ให้กับยาสูบ 3 สายพันธุ์ คือ HR WR และ S ซึ่งอ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืช พบว่า สายพันธุ์ HR ที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานจะได้รับผลกระทบจากสารไกลโฟเสทเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ WR และ S ไม่ว่าจะใช้ไกลโฟเสทอัตรา 800 หรือ 1,600 กรัม/เฮกตาร์

ยีนรายงานผล (reporter gene)

เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีน โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารคัดเลือกรุ่นอื่น ๆ และสามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเหล่านี้ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจสอบได้ง่าย ยีนรายงานผลที่นิยมใช้กันมาก คือ ยีน β -glucuronidase (*gus*) ยีนนี้เป็นยีนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ K12 ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase ซึ่งสามารถ hydrolyze สารตั้งต้นที่ไม่มีสี คือ สาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) ได้เป็นสารที่มีสีน้ำเงินเข้มบนเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้เข้าไป และมีความคงทนสูงไม่ละลายในแอลกอฮอล์ (Jefferson *et al.*, 1987) เรียกการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ว่า GUS histochemical assay แต่หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีนี้จะทำให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถนำเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ต่อได้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression detection)

การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในพืช มักใช้การตรวจสอบยีนรายงานผล (reporter gene) ซึ่งเป็นยีนที่สามารถติดตามได้ง่าย ทำให้ทราบว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปนั้นเข้าไปในเซลล์พืชหรือไม่ ยีนรายงานผลที่นิยมมากที่สุดคือ ยีน *gusA* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase เมื่อ hydrolyze กับสารละลาย X-Gluc ทำให้ได้สารที่มีสีน้ำเงินเข้มบนเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและมีความคงทนสูงไม่ละลายในแอลกอฮอล์ ฉะนั้นถ้าสร้างพลาสมิดที่มียีนรายงานผลเกาะติดกับยีน

อื่นที่ต้องการ เมื่อตรวจสอบยีนรายงานผลแล้วให้ผลเป็นบวก จะสามารถคาดหวังได้ว่ายีนที่ต้องการนั้นเข้าไปในเซลล์พืชด้วย อย่างไรก็ตามถ้าตรวจสอบยีนรายงานผลเร็วเกินไป ผลบวกที่ได้จะไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนเหล่านั้นเข้าไปเชื่อมต่อกับจีโนมของพืชได้อย่างถาวร แต่เป็นวิธีที่ชี้ว่ายีนได้เข้าไปในเซลล์พืชเท่านั้น (อุไรวรรณ, 2545)

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนแบบถาวร (stable transformant)

เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของพืชอย่างถาวร โดยตรวจสอบหลังจากการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารคัดเลือกสิ้นสุดแล้ว การตรวจสอบสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของพืช แต่ไม่สามารถบอกได้ว่ายีนนั้นสามารถแสดงออกได้หรือไม่ ข้อดีของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้เร็วแม้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ใช้เนื้อเยื่อน้อยและทราบผลได้ภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง ส่วนข้อเสีย คือ เกิด false positive ได้ง่ายและเครื่องมือมีราคาแพง

2. การตรวจสอบโดยเทคนิค Southern blot analysis เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของพืช โดยอาศัยหลักของดีเอ็นเอที่สามารถจับคู่กันได้ (complementary) ระหว่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบ (probe) และเป็นวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยจำนวนและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (อุไรวรรณ, 2545)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง

Szabados *et al.* (1987) ได้ทดลองชักนำเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง 15 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงจากส่วนยอดให้เกิด somatic embryogenesis โดยใช้ส่วนยอดอ่อน และใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D, GA₃, BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะชักนำจะเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 16 มิลลิกรัมต่อลิตรในส่วนใบอ่อนของสายพันธุ์

M Col 1505 การชักนำให้เกิด somatic embryo จะเติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ GA₃ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ช่วยชักนำ somatic embryo ได้ดีที่สุด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนลำปะหลังโดยใช้ตุ่มใบอ่อน (immature leaflobe) ให้เป็น somatic embryos และชักนำให้กลายเป็นต้น โดยการเติมฮอร์โมนออกซินลงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) เป็นสูตรพื้นฐาน จะทำให้เกิด somatic embryo ได้ (Stamp and Henshaw, 1987; Szabados *et al.*, 1987) ซึ่งยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และสามารถชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (Raemakers *et al.*, 1993)

Li *et al.* (1998) ได้ศึกษาการชักนำม้นลำปะหลังที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิด organogenesis โดยเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS โดยเติมฮอร์โมนต่าง ๆ พบว่าม้นลำปะหลังจะกลายเป็นยอดได้ดีที่สุดเมื่อใช้ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

รังสีและคณะ (2551) สร้างม้นลำปะหลังเตตราพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างและตายอดของม้นลำปะหลัง 3 พันธุ์คือ ระยะเวลา 7 ระยะของ 90 และเกษตรศาสตร์ 50 ร่วมกับการใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.002-0.003% ผสม DMSO 2% พบว่าตัวอย่างม้นลำปะหลังจำนวน 33-58% สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปเป็นต้นกล้าที่มีลักษณะโพลิพลอยด์ที่มีต้นเดี่ยว ข้อดี ใบหนา เจริญเข้ม หยักเว้าน้อย การเจริญเติบโตช้า มีรากใหญ่และสั้นรวมทั้งมีปริมาณน้อยกว่าต้นปกติ และการคัดเลือกม้นลำปะหลังโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีการตัดเป็นข้อ ๆ ละ 1 ตา ปฏิบัติซ้ำทุก 4-6 ชั่วโมง จะได้ต้นกล้าม้นลำปะหลังโพลิพลอยด์ที่ไม่มีลักษณะ chimera 100%

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์หัวยวง 60

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วยชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมระบบไฟให้แสงสว่าง เครื่องเขย่าและเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ค้อนมิด และใบมีดผ่าตัด ปากคิบ จานแก้ว และตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบเตาไมโครเวฟ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องกวนสารเคมี แท่งแม่เหล็ก เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ซ้อนตักสาร และเครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ เป็นต้น

2.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการถ่ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ ได้แก่ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เครื่องกวนตะกอน (Vortex[®]) และเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบการถ่ายยีนในระดับโมเลกุล ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบสโคป (Olympus รุ่น SZX12) เครื่อง Thermocycler (Biometra[®]) สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation system) พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส) เครื่อง hybridizer และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Southern blot เป็นต้น

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่

3.1.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

3.1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ได้แก่ 6-benzyladenine (BA), α - Naphthylene acetic acid (NAA)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ acetosyringone (Fluka, Germany) และสารปฏิชีวนะ ได้แก่ cefotaxime (Claraxim[®] 1.0, Siam Bhiasach Co., Ltd.) และ kanamycin (A.N.B. Laboratories Co., Ltd.)

3.3 สารที่ใช้คัดเลือเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน คือ N-(Phosphonomethyl) glycine, 96% (Sigma-Aldrich, USA)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ trypton, yeast extract, sodium chloride และวุ้นผง

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ได้แก่ QIAprep miniprep[®] spin column kit (บริษัท QIAGEN)

3.6 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) ได้แก่ disodium hydrogen orthophosphate (Na_2PO_4), sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), potassium ferrocyanide ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), ethylenediamine tetra acetic acid disodium salt dehydrate (Na_2EDTA), Triton X-100 และสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) (บริษัท Fermentas)

4. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ภายในบรรจุพลาสมิด pCAM1304-EPSPS เป็น binary vector ประกอบด้วยยีนรายงานผลยีน β -glucuronidase (*gus*) และยีน *aroA* เป็นยีนควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทโดยจะผลิต 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ที่ถูกสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทไปยับยั้งให้เพิ่มปริมาณมากขึ้น สำหรับใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนทั้งสองส่วนนี้มีโปรโมเตอร์ 35SCaMV เป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและเทอร์มินเตอร์ คือ NOS เป็นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการหยุดการแสดงออกของยีน

5. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *aroA* ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส

Forward – 5' CCATTCCGCTCGAGATGGCACAAATTAACAACATGGC 3'

Reverse – 5' ATCCACCGCTCGAGCGGTCATCAGGCAGCCTTCGTAT 3'

วิธีการ

1. การเตรียมพืชที่ใช้ในการทดลอง

นำส่วนลำต้นมันสำปะหลังมาทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 0.6% เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นตัดผิวนอกของส่วนยอดหรือตาออก แล้วนำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% , CuSO_4 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร, GA_3 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม phytagel 0.2% เพื่อให้แข็ง (อาหารสูตร CM) เปลี่ยนอาหารอย่างสม่ำเสมอในสูตรอาหาร CM ทุก ๆ 14 วัน เป็นเวลา 60 วัน เก็บไว้ในอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตร ต่อวันที่เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1.1 การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีต่อแคลลัสมันสำปะหลัง

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมด และเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ โดยคัดเลือกแคลลัสมันสำปะหลังที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีค่า $OD_{600} = 0.6-0.8$ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นซับเนื้อเยื่อให้แห้งบนกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสของมันสำปะหลังร่วมกับเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 7 วัน เป็นเวลา 14 วัน โดยคัดเลือกแคลลัสขนาดเท่า ๆ กันมา 10 ชิ้น ต่อทริทเมนต์ละ 2 ซ้ำ ตรวจสอบและบันทึกขึ้นเนื้อเยื่อที่ไม่พบเชื้อ *A. tumefaciens* เจริญอยู่ และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

1.2 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่สามารถทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังตาย

ศึกษาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่สามารถทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมด โดยนำเนื้อเยื่อของมันสำปะหลังมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสของมันสำปะหลัง และเติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ที่ระดับความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยคัดเลือกแคลลัสขนาด เท่า ๆ กันมา 10 ชิ้น ทริทเมนต์ละ 2 ซ้ำ ตรวจสอบและบันทึกการตายของเนื้อเยื่อที่ได้รับระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วเลือกระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังตายทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นระดับความเข้มข้นสำหรับการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป

2. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้สำหรับถ่ายยีน

2.1 การนำพลาสมิด pCAM1304-EPSPS เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock

นำพลาสมิด pCAM1304-EPSPS (ภาพผนวกที่ 1) ที่มียีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช ไกลโฟเสต (*aroA*) และยีนรายงานผล *gus* ซึ่งจาก left border ถึง right border มีขนาด 6,128 คู่เบส เข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดนี้ โดยใช้วิธี heat shock transformation แล้วเพาะเลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร คัดเลือกโคโลนีเดียวที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะได้ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAM1304-EPSPS ที่มียีน *nptII* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จากนั้นนำโคโลนีเดียวที่ได้มาเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN) และนำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบอีกครั้ง โดยนำพลาสมิดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งการตัดอยู่ในพลาสมิด pCAM1304-EPSPS ที่สกัดได้ เช่น เอนไซม์ *HindIII* *XhoI* หรือ *EcoRI* เพื่อเป็นการยืนยันโคลนของ *E. coli* ที่ได้ว่ามีพลาสมิด pCAM1304-EPSPS ตามต้องการ

2.2 การนำพลาสมิด pCAM1304-EPSPS เข้าสู่ *A. tumefaciens* โดยใช้วิธี electroporation

เตรียม competent cell ของ *A. tumefaciens* (ภาพผนวกที่ 4) แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง จากนั้นนำพลาสมิด pCAM-EPSPS1304 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม เติมลงใน competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน คัดส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในหลอด electroporation cuvette ขนาดช่อง 0.2 เซนติเมตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วใส่ electroporation cuvette ลงในช่องสำหรับผ่านกระแสไฟฟ้าของเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad®) และกดปุ่มปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าเครื่อง โดยตั้งค่าตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) 2.5 กิโลโวลต์ กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า (field strength) 12.5 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) 25 ไมโครฟารัด ค่าความต้านทาน (resistance) 600 โอห์ม และใช้ระยะเวลา 4.7 มิลลิวินาที เมื่อให้กระแสไฟฟ้าแล้วรีบดึง cuvette ออก แล้วเติมอาหารเหลว SOB (ตารางผนวกที่ 3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด electroporation cuvette ทันที ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วดูดของเหลวทั้งหมด ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศา

เซลล์เชื้อ โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดอาหาร SOB ที่ทิ้ง โดยให้เหลืออยู่ในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นดูดสารแขวนลอย ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร SOB ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนี เดียวที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะได้ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับ การถ่ายพลาสมิด pCAM1304-EPSPS มาตรวจสอบพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ *aroA* ก่อนที่จะนำเซลล์นั้นไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อที่จะใช้ ในการถ่ายยีนต่อไป

เพาะเลี้ยง *Agrobacterium* ที่มียีน *aroA* บนอาหารวุ้นสูตร LB ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมา เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมน้ำลงไป 1 มิลลิตร ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200-250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง $A_{600} = 0.6-0.8$ นำเซลล์ แขวนลอยไปเจือจางในอาหารเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในสัดส่วน 1:50 เมื่อนำไปใช้สำหรับถ่ายยีน

3. การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*

ใช้ใบมีดตัดชิ้นส่วนของแคลลัสใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่มีสีเขียวอ่อนสม่ำเสมอ ใช้ใบมีดที่คมกรีดให้เป็นรอยแผล แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304-EPSPS ความเข้มข้นเชื้อต่ออาหารเหลวสูตร CM 1:50 และใส่ร่วมกับ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปิดฝา เขย่าเบา ๆ ทิ้งไว้ 15 30 45 และ 60 นาที วางชิ้นแคลลัสลงบนกระดาษซับที่ปลอดเชื้อเพื่อซับเอาแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 0 1 3 และ 5 วัน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น เวลา 2 สัปดาห์ เพื่อฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS ที่เติม BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ร่วมกับ cefotaxime 300 มิลลิกรัม ต่อลิตร เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยง

บนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987)

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay

นำชิ้นเนื้อเยื่อมันสำปะหลังที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในเนื้อเยื่อพืชตามวิธีของ Jefferson (1987) โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อ มาแช่ในสารละลาย X-Gluc solution mix (0.1 M NaPO₄ buffer, 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 1.0 mM X-Glucuronide และ 0.1% TritonX-100) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นเนื้อเยื่อมาตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ บันทึกเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินและให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน โดยมีเกณฑ์คือ 0 คะแนน ไม่เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืช, 1 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 1-10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 2 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 11-20 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 3 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 21-30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 4 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 31-40 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 5 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 41-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 6 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 51-60 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 7 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 61-70 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 8 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 71-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่, 9 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 81-90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ และ 10 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 91-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ ทำ 3 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี least significant difference (LSD)

5. การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้วิธี CTAB (Aldrich and Cullis, 1993) โดยนำเซลล์ของมันสำปะหลังใส่ในหลอดเซนติฟิวด์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่ไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว เติมสารละลาย extraction buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex® และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 60 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนใส่หลอดเซนติฟิวด์หลอดใหม่ แล้วเติมสารผสม chloroform : isoamyl

alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที และนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนไว้ในหลอดชนิดฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที อีกครั้ง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนไว้ในหลอดชนิดฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรน้ำส่วนใสที่ได้ จากนั้นเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรน้ำส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บดีเอ็นเอไว้ จากนั้นเติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดชนิดฟิวส์ที่มีตะกอนดีเอ็นเออยู่ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาผึ่งให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่มีเอนไซม์ Rnase/DNAse-free (US Biological, USA) 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Λ DNA marker) บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที ใน 0.5X TBE buffer และย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจดูขนาดและความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพ จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *aroA* โดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้

Forward – 5' CCATTCGCTCGAGATGGCACAAATTAACAACATGGC 3'

Reverse – 5' ATCCACCGCTCGAGCGGTCATCAGGCAGCCTTCGTAT 3'

โดยขั้นตอนแรก ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามลำดับ และขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดตรวจสอบผลโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 0.8 % ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) เมื่อครบเวลานำเจลมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ

6. การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค dot blot hybridization

หลังจากที่ทราบผลการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว ยืนยันผลเพิ่มเติมโดยการนำดีเอ็นเอจากข้อ 5 มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนคือ การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ (probe) ที่จำเพาะกับยีน *aroA* การเตรียม DNA blot และ การทำปฏิกิริยา hybridization ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้ นำดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ส้มตำปะหลัง ทั้งที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีน *aroA* มาตัวอย่างละ 2 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วนำมาแช่น้ำแข็งโดยทันที จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอมาหยดลงบนไนลอนเมมเบรน (Hybond-N⁺ บริษัท Amersham) ผึ่งเมมเบรนให้แห้ง แล้วนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับเมมเบรน จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยา hybridization กับดีเอ็นเอตรวจสอบ

7. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลัง โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

7.1 การเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน

ภายหลังจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสและตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย UV-transilluminator แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอนี้ไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N⁺ บริษัท Amersham) ซึ่งมีขั้นตอนคือล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย depurination (250 mM HCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อแล้ว จากนั้นปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH และ 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกรอบ ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว จากนั้นจึงเติมสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCl; pH 7.5 และ 1.5 M NaCl) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกรอบ ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาอยู่บนไนลอนเมมเบรนโดยวางกระดาษ Whatman 3 MM ใช้เป็นสะพานในอ่างที่มีสารละลาย 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.5 M Na-citrate; pH 7.0) นำเจลที่ได้จากขั้นตอนด้านบนแช่ในสารละลาย 10X SSC ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่

อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลวางคว่ำหน้าลงบนกระดาษ Whatman 3 MM จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล วางทับด้วยกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลาย ๆ ชั้น ให้มีความหนา 20 เซนติเมตร จากนั้นวางวัตถุที่มีน้ำหนัก 500 กรัม ทับบนกระดาษซับอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลขึ้นมาติดอยู่บนไนลอนเมมเบรน จากนั้นลอกไนลอนเมมเบรนออกจากเจลแล้วนำมาแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 5 นาที ฟling ไนลอนเมมเบรนให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอนเมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันในขั้นตอนต่อไป

7.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สำหรับปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค PCR labeling

ใช้พลาสมิด pCAM1304-EPSPS เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ โดยใช้ความเข้มข้นของพลาสมิด 200 พิโคกรัม และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน *aroA* ชนิด Forward และ Reverse อย่างละ 0.125 ไมโครโมลาร์ และติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้ฟิชีอาร์ DIG Labeling kit (Roche Applied Science) โดยใช้อุณหภูมิเช่นเดียวกับปฏิกิริยาฟิชีอาร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA*

7.3 การทำปฏิกิริยา hybridization และการตรวจสอบ

นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาทำ pre-hybridization ในสารละลาย hybridization ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ไนลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนติฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งที่มีเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย hybridization 1 มิลลิลิตรในหลอดดังกล่าว นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดเติมลงในหลอด hybridization ที่มีไนลอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (2X SSC, 0.1% SDS) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและทำซ้ำอีกรอบ แล้วล้างด้วยสารละลาย low stringency buffer (0.1X SSC, 0.1% SDS) โดยเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ แล้วล้างไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer

ที่เติม Tween 20 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง ย้ายไนลอนเมมเบรนลงในถุงพลาสติกเติมสารละลาย blocking solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถุงและปิดปากถุงให้สนิทนำไปแช่เบา ๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไนลอนเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphate ที่เจือจาง 1 : 10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution แช่เบา ๆ ที่อุณหภูมิ นาน 30 นาที ล้างไนลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วแช่ไนลอนเมมเบรนในสารละลาย detection buffer นาน 5 นาที โดยไม่ต้องเขย่า ย้ายไนลอนเมมเบรนมาวางลงบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย detection buffer เข้ากับ chemiluminescent substrate (CDP starTM) ในอัตราส่วน 1 :500 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปเคลี่ยลงบนไนลอนเมมเบรนให้ทั่ว วางไนลอนเมมเบรนไว้ในที่มีदनาน 1 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง นำไนลอนเมมเบรนไปประกบแผ่นฟิล์มโดยทำในห้องมืด นาน 10-60 นาที เมื่อครบกำหนดจึงล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

8. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

9. ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มทดลองตั้งแต่ เดือนมิถุนายน 2550 สิ้นสุดการทดลอง เดือนพฤษภาคม 2553

ผลและวิจารณ์

การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะที่มีต่อแคลลัสมันสำปะหลังและสารกำจัดวัชพืชที่ใช้คัดเลือก
เนื้อเยื่อมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีน

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อ และหาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ซึ่งใช้สำหรับการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่
ผ่านการถ่ายยีนที่มียีน *aroA* เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก (selectable marker gene)

1. การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีต่อแคลลัสมันสำปะหลัง

จากการทดลองนี้ได้นำแคลลัสมันสำปะหลังที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5
มิลลิเมตร จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีค่า $OD_{600} = 0.6-0.8$
เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นซับเนื้อเยื่อให้แห้งบนกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเนื้อเยื่อไป
เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้นของมันสำปะหลังร่วมกับเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความ
เข้มข้น 0 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 300 และ
500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมด 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และ
ภาพที่ 1) และเนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้อย่างปกติไม่แตกต่างกัน ซึ่งฉัตรนภา (2545) ใช้สารปฏิชีวนะ
cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังการถ่าย
ยีนเข้าสู่ถั่วเขียว พบว่าความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อการเกิดยอด โดยยอดที่ได้จะมีขนาดสั้นลง ส่วน
นุชจรี (2552) ใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัด
เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ได้หมด และที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม
ต่อลิตร มีผลต่อความสูงของยอด *Cryptocoryne* คือ ทำให้ยอดที่ได้มีขนาดสั้นลง

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ออกจากแคลลัสมันสำปะหลังเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรชักนำแคลลัสของมันสำปะหลังร่วมกับเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 7 วัน เป็นเวลา 14 วัน

ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ cefotaxime (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่สามารถกำจัดเชื้อ <i>A. tumefaciens</i> ^{1/} ได้
0	0
300	100
500	100

^{1/} เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้ = $\frac{\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่มีเชื้อ} \times 100}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด}}$



ไม่เติม cefotaxime



ความเข้มข้น 300 มก./ล.



ความเข้มข้น 500 มก./ล.

ภาพที่ 1 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในแคลลัสของมันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ

Cefotaxime เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังจากการถ่ายยีนเป็นสารในกลุ่มเดียวกับ carbenicillin และ penicillin G ซึ่งจะออกฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ สามารถกำจัดแบคทีเรียได้หลายชนิดและมีพิษต่อเซลล์โปรคาริโอต สารปฏิชีวนะชนิดนี้จะเข้าไปจับกับ penicillin binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ inner membrane ที่มีส่วนช่วยในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ transpeptidase ซึ่งมีหน้าที่เชื่อมต่อรอยขาดของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดสภาพ osmotic shock และสุดท้ายทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกออก (Mathais and Boyd, 1986) นอกจากนี้ Robert *et al.* (1989) ยังพบว่า carbenicillin และ penicillin G มีโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินอีกด้วย

การเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจทำให้มีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของพืช เช่น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของแคลลัสและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชได้ (Mathais and Boyd, 1986) ดังนั้นในการเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสม ควรเลือกความเข้มข้นของสารในระดับที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมด และมีผลเชิงลบต่อการเจริญของเนื้อเยื่อน้อยที่สุด ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้

นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime อาจให้ผลกระทบเชิงบวกต่อการเกิดยอดของเนื้อเยื่อพืชได้ เช่น การทดลองของ Caboni *et al.* (1999) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของสาเลีป่านอาหารแข็ง LP พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ถึง 4.2 ยอดต่อชิ้น ในขณะที่อาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เกิดยอดได้เพียง 2.6 ยอดเท่านั้น และได้อธิบายว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime เป็นสารที่เพิ่มความสามารถในการพัฒนาทางด้านพื้นฐานของพืช อีกทั้งสารปฏิชีวนะ cefotaxime เป็นสารโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน

จากผลการทดลองดังกล่าวแล้ว เลือกใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการล้างเนื้อเยื่อและกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังจากการถ่ายยีนก่อนนำเนื้อเยื่อไปตรวจการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว และใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ร่วมกับการ

คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเดิมสารปฏิชีวนะลงในอาหารคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานไม่ต่ำกว่า 1 เดือน

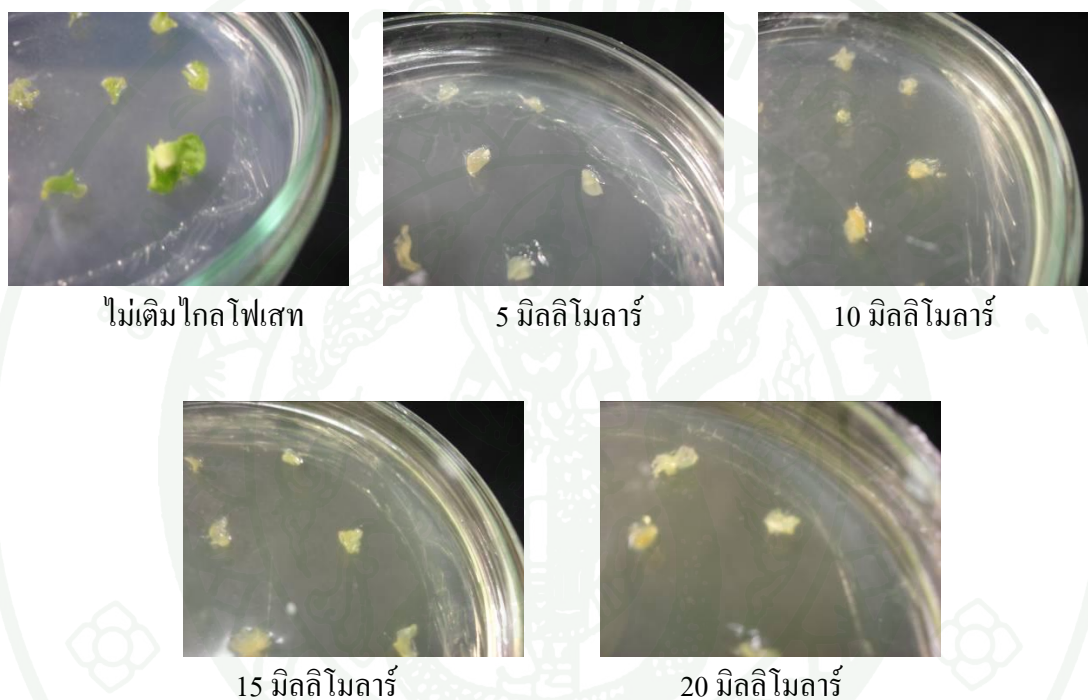
2. การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ทำให้เนื้อเยื่ออ่อนล้มตาย

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ทำให้เนื้อเยื่ออ่อนล้มตายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมด พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท เนื้อเยื่อยังมีการแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นยอดและใบเลี้ยงเกิดขึ้นใหม่ สำหรับเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีการเจริญเติบโต และจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองและตายภายใน 2-3 สัปดาห์ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ทำให้เซลล์อ่อนล้มตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 4 คือ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ซึ่งความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่เหมาะสมนั้น อาจขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ขนาดของชิ้นพืช อายุของพืช (Widholm *et al.*, 2001)

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชนอกจากมีอินทรียวัตถุและยีนที่น่าสนใจแล้วมักจะมีอินทรีย์หนามแหลมเพื่อช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การใช้ยีนคัดเลือกที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชให้ประสบความสำเร็จ โดยยีนเครื่องหมายที่แทรกเข้าไปรวมตัวอยู่ในจีโนมของพืชหลังจากการถ่ายยีนจะทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนแสดงลักษณะต้านทานต่อสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเพาะกับยีนที่ใช้ในการคัดเลือก ทำให้เซลล์ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ (Komari *et al.*, 1996) โดยยีนคัดเลือกส่วนใหญ่มักเป็นยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (Miki and McHugh, 2004)

สารที่ใช้ในการคัดเลือกต้องสอดคล้องกับยีนคัดเลือกที่ใช้ และความเข้มข้นของสารคัดเลือกต้องเหมาะสมต่อชนิดและพันธุ์พืช เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่ำเกินไป จะทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ มีผลทำให้การคัดเลือกล้มเหลวไม่ประสบผลสำเร็จ ทำให้ต้นที่ได้จากการคัดเลือกบางต้นเป็นต้นที่ไม่มียีนเข้าไปแทรกในจีโนม และในทางตรงกันข้ามการใช้สารคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินไป อาจทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นสามารถทนทานต่อสารคัดเลือกได้ในระดับ

ความเข้มข้นหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตายอาจปล่อยสารชนิดอื่นที่เป็นพิษมายับยั้งการเจริญ หรือไปขัดขวางการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ยังมีชีวิตอยู่ (Zhang *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด เพื่อใช้กำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถมีชีวิตรอดได้ ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตาย ซึ่งมักจะเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายทั้งหมด



ภาพที่ 2 ผลของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อความมีชีวิตของแคลลัสมันสำปะหลัง เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

การถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens*

ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) มีผลต่อความสำเร็จในการถ่ายยีน เนื่องจากเป็นช่วงที่ช่วยทำให้เชื้อยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืชได้ (Yong *et al.*, 2006) จากการถ่ายยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชเข้าสู่มันสำปะหลังด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304-EPSPS พบว่า หลังจากการถ่ายยีนแล้วเป็นเวลา 7 วัน เมื่อสุ่มนำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีนมาจำนวน 25 เพลอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* แบบชั่วคราวด้วย

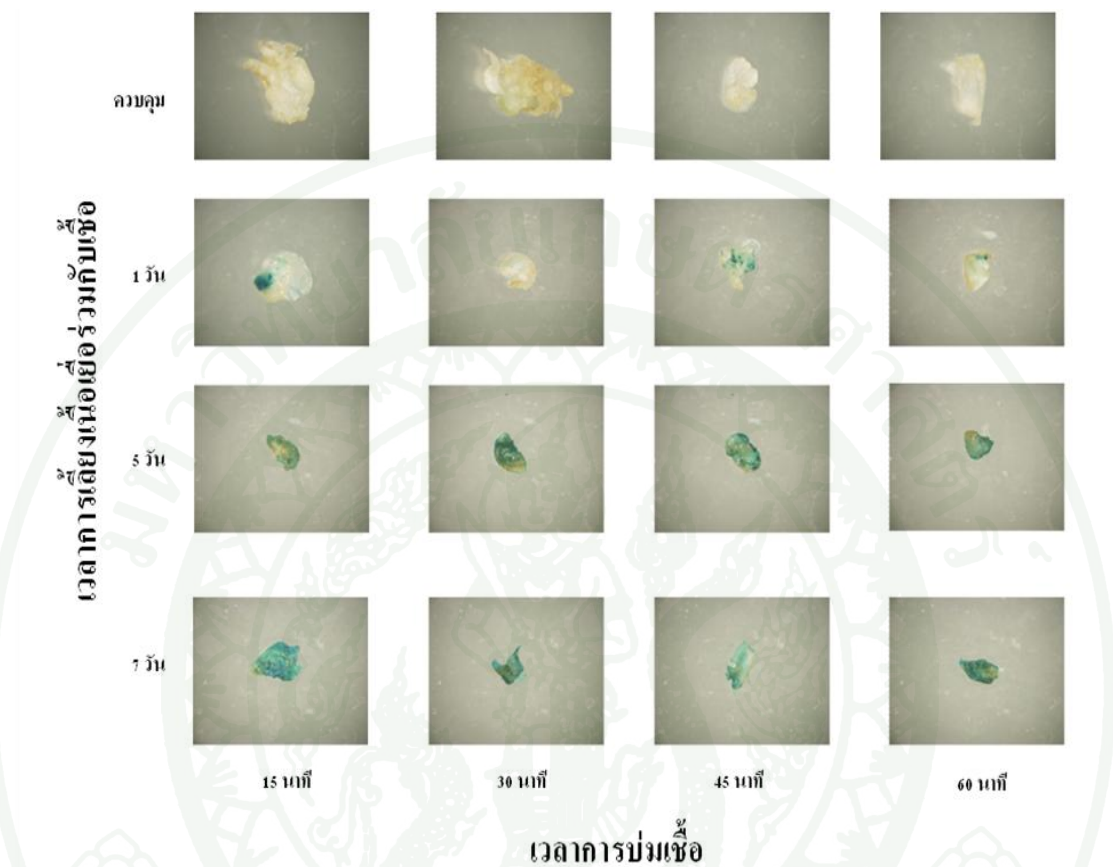
วิธี GUS histochemical assay (ภาพที่ 3) ได้เนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุดในขั้นตอนปลูกเชื้อที่ใช้ระยะเวลา 60 นาที และใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งได้คะแนนพื้นที่การติดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงถึง 9 คะแนนจากคะแนนเต็ม 10 แต่เมื่อสุมเอาเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วเป็นเวลา 14 วัน มาตรวจสอบ (ภาพที่ 4) พบว่าการปลูกเชื้อที่ 30 นาที และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ เป็นเวลา 3 วัน ให้ผลดีที่สุดคือ ได้เนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุดเป็นคะแนน 5 คะแนน (ตารางที่ 2) จากรายงานของ Wu *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อกับข้าวสาลีนาน 0 0.25 0.5 1 2 3 และ 5 ชม. พบว่า เมื่อระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานขึ้นการแสดงออกของยีน *gus* จะสูงขึ้น การปลูกเชื้อนาน 5 ชม. พบการแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ระยะเวลานานเกินไปเนื้อเยื่อพืชจะถูกทำลายโดยเชื้อ *A. tumefaciens* มากขึ้น ทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นและอัตราการรอดชีวิตลดลง

เมื่อสังเกตปัจจัยระยะเวลาในการบ่มเชื้อกับแคลลัสมันสำปะหลังที่ระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อตรวจสอบที่ 7 และ 14 วันหลังจากทำการถ่ายยีน จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อแคลลัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยค่า $P > 0.05$ คือ 0.3969 และ 0.1919 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ ที่ 7 วันหลังจากทำการถ่ายยีน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จะได้ค่าคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 8.3 โดยค่า $P < 0.05$ คือ < 0.0001 ส่วนที่ 14 วันหลังจากทำการถ่ายยีน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ได้คะแนนเฉลี่ยการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 3.3 โดยค่า $P < 0.05$ คือ 0.0049

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างขั้นตอนการบ่มเชื้อกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า $P < 0.05$ คือ 0.0032 และ 0.018 ตามลำดับ โดยการปลูกเชื้อ 60 และ 30 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ 5 และ 3 วัน มีค่าเฉลี่ยการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแคลลัสเป็น 9.0 และ 5.0 ภายหลังการถ่ายยีน 7 และ 14 วันตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการสังเกตพบว่าหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 7 วัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อนาน 5 วัน คะแนนเฉลี่ยจะอยู่ที่ 8.3 ซึ่งถือว่ามากที่สุด แต่เมื่อระยะเวลาหลังจากการถ่ายยีนเพิ่มเป็น 14 วัน คะแนนเฉลี่ย กลับลดลงเหลือ 2.0 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังนั้น ยีนที่ถูกส่งผ่านเข้าไปในเซลล์พืชไม่ได้เข้าไปรวมตัวกับจีโนมพืช จึงทำให้บางส่วนถูกย่อยสลายด้วย

เอนไซม์ nuclease ที่อยู่ภายในเซลล์พืชได้ง่าย (Cooper, 2000) ทำให้การแสดงออกของยีนรายงาน
ผลลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป

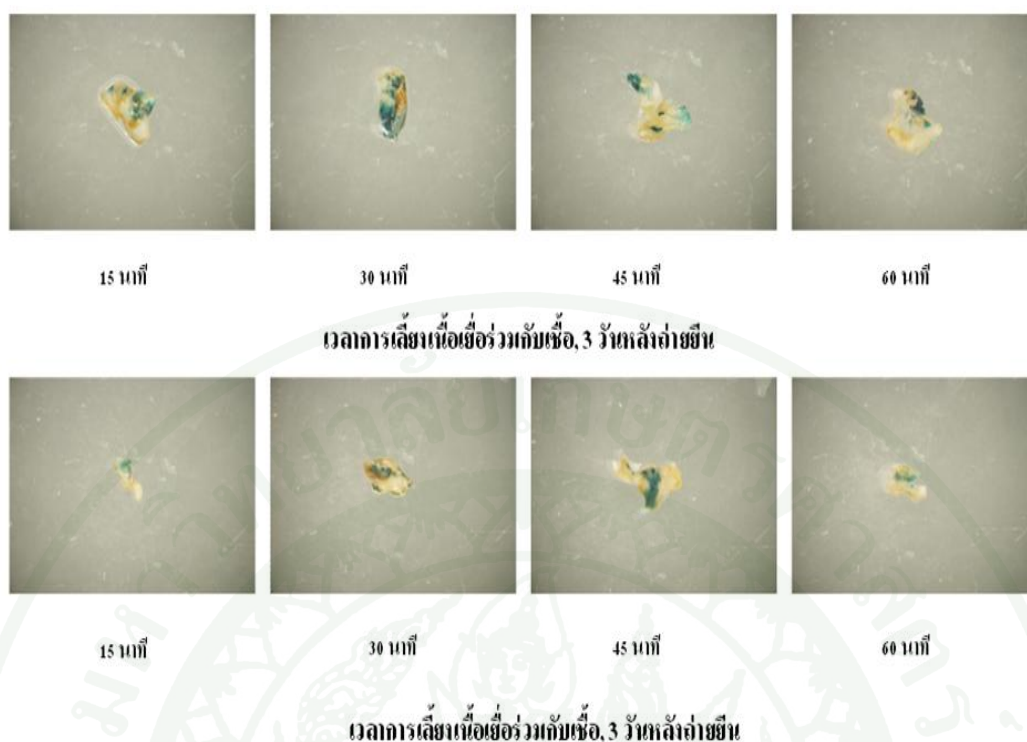


ภาพที่ 3 transient expression ของยีน *gus* ในเซลล์ต้นสำปะหลัง ที่ปลูกเชื้อและเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังการถ่ายยีน 7 วัน

ตารางที่ 2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการปลูกเชื้อ (inoculation) กับการเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ที่มีต่อการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus*

การเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (วัน)	7 วันหลังถ่ายยีน					14 วันหลังถ่ายยีน				
	การบ่มเชื้อ (นาท)				ค่าเฉลี่ยการ เลี้ยงเชื้อ รวม	การบ่มเชื้อ (นาท)				ค่าเฉลี่ย การเลี้ยง เชื้อรวม
	15	30	45	60		15	30	45	60	
0	0 g ^{1/}	0 g	0 g	0 g	0	-	-	-	-	-
1	2.3 ef	0.67 fg	3.67 e	0.67 fg	1.8	-	-	-	-	-
3	5.67 d	7.0 bcd	6.3 cd	5.67 d	6.2	3.0 ab	5.0 a	3.0 ab	2.3 b	3.3
5	8.3 ab	8.3 ab	7.67 abc	9.0 a	8.3	1.0 b	1.7 b	2.3 b	3.0 ab	2
ค่าเฉลี่ยการบ่ม	4.1	4.0	4.4	3.8		2.0	3.3	2.7	2.7	
การบ่มเชื้อ			0.3969		ns			0.1919		ns
การเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ			<0.0001		**			0.0049		**
การบ่มเชื้อxการเพาะเลี้ยงร่วม			0.0032		*			0.0188		*
%CV					20.61					37.5

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

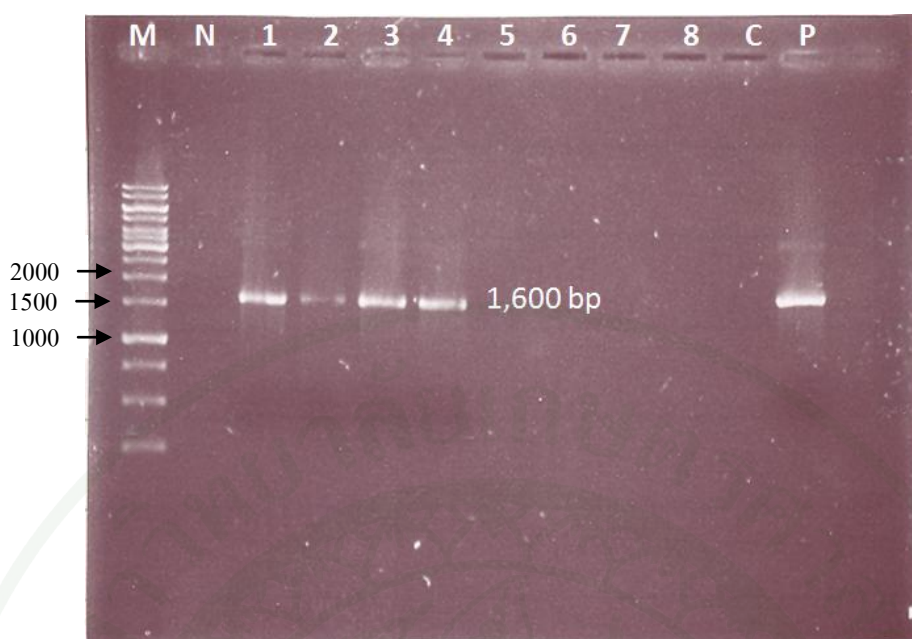


ภาพที่ 4 transient expression ของยีน *gus* ในแคลลัสมันสำปะหลัง ที่ปลูกเชื้อและเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังการถ่ายยีน 14 วัน

การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 8 ตัวอย่างซึ่งนำมาจากทริทเมนต์การทดลองการบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 นาที กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีขนาด 1,600 คู่เบส ดังภาพที่ 5 โดยพบว่าแคลลัสมัน สำปะหลังบางชิ้นมีการแสดงออกของยีน *gus* เกิดสีน้ำเงินขึ้นที่แคลลัส แต่เมื่อนำมาตรวจสอบความ คงอยู่ของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วไม่พบยีน *aroA* นั้นอาจเนื่องมาจากในกระบวนการการถ่ายยีนโดย ใช้ *A. tumefaciens* นั้น กระบวนการส่งถ่ายและแทรกตัวของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืชนั้นมักนำส่วน right border เข้าสู่จีโนมพืชก่อน (Sheng and Citovsky, 1996) พลาสมิด pCAM1304-EPSPS ที่ใช้ ในการทดลองนี้มียีน *gus* เป็นยีนที่อยู่บริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งเป็นด้านที่เข้าเข้าไป เชื่อมกับโครโมโซมของเซลล์พืชก่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าส่วนของยีน *aroA* ที่อยู่ทางด้าน left border ของ T-DNA อาจเกิดการขาดหายไประหว่างการถ่ายยีน จึงทำให้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี

GUS histochemical assay แล้วเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงิน แต่เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจสอบหา ยีน *aroA* ด้วยวิธีพีซีอาร์กลับไม่พบยีนดังกล่าว สำหรับกรณีที่บางเซลล์ที่มียีน *gus* เพียงยีนเดียว แต่ยังสามารถเจริญและพัฒนาเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร ไกลโฟเสทได้ อาจเนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ที่มีความหนาพอควร จึงอาจมีเนื้อเยื่อบางส่วนไม่สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ดังนั้นความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่เคลื่อนย้ายเข้าไปในเนื้อเยื่อเหล่านี้ อาจเจือจางลง ทำให้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมดเซลล์จึงเจริญขึ้นมาได้บนอาหารคัดเลือก หรืออาจเกิดจากการที่เซลล์ดังกล่าวมีลักษณะเป็น chimera คือ ในเซลล์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่มีเซลล์บางส่วนมียีนที่ถูกถ่ายเข้าไปปะปนอยู่กับเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือก ซึ่งการเกิดลักษณะดังกล่าวนี้ Zhong *et al.* (1996) รายงานว่าในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม ที่นำเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนนั้น ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า chimera ได้มากซึ่งจัดเป็นปัญหาหลักของการถ่ายยีน การเลือกใช้เนื้อเยื่อชนิดนี้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนจึงมีข้อจำกัด แต่มักจะใช้ในกรณีที่การชักนำให้เกิดยอดจากเซลล์หรือจากแคลลัสทำได้ยากเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามปัญหาการเกิด chimera สามารถแก้ไขได้โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อชักนำให้ได้ยอดจำนวนมากและรวดเร็ว ร่วมกับการ subculture ในระยะเวลาที่สั้นลง เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะได้ยอดที่ไม่เป็น chimera แล้วคัดเลือกยอดที่ได้บนอาหารคัดเลือกซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนออกให้หมด



ภาพที่ 5 ลักษณะแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในเซลล์สมัน
 สำปะหลังที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก โดยการใช้วิธี พีซีอาร์ (Polymerase Chain
 Reaction; PCR)

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (บริษัท Fermentas)

N = น้ำ (negative control)

C = ดีเอ็นเอของม้นสำปะหลังที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

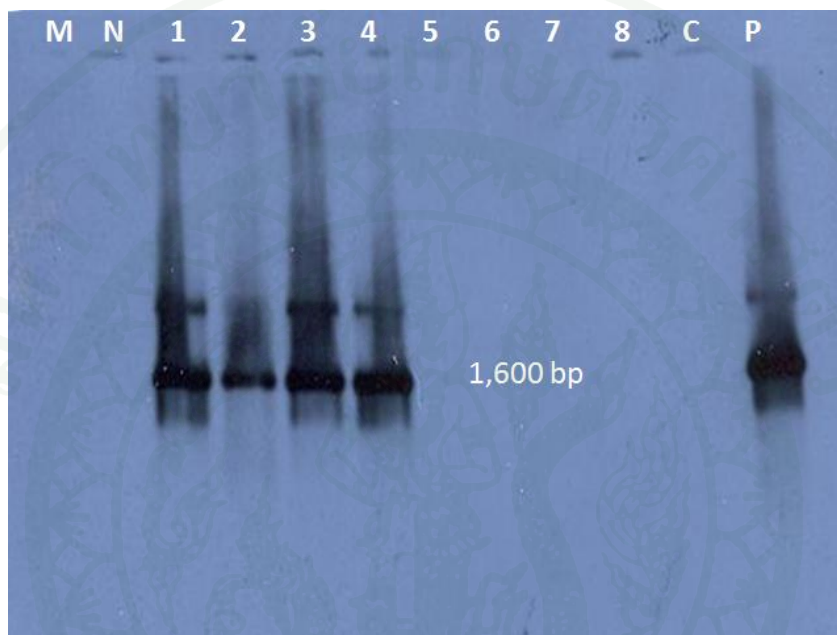
P = พลาสมิด pCAM1304-EPSPS

1-8 = ดีเอ็นเอของเซลล์สมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีน

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลัง โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

การตรวจสอบการเข้าร่วมตัวของยีน *aroA* กับจีโนมของมันสำปะหลังโดยเลือกตรวจสอบ
 กับตัวอย่างมันสำปะหลังที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีน โคลนที่ 1-8 ซึ่งจากผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์
 พบแถบดีเอ็นเอของยีน *aroA* ขนาด 1,600 คู่เบส จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นไนลอน
 เมมเบรน และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization โดยการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอ
 ตรวจสอบของยีน *aroA* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้งีส์ digoxigenin (DIG) จากนั้นตรวจสอบผลโดยนำ
 เมมเบรนไปทาบกัมแผ่นฟิล์ม X-ray เป็นเวลา 60 นาที จากผลการทดลองพบว่า เกิดแถบสีดำบน
 แผ่นฟิล์ม ตรงกับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ของยีน *aroA* ซึ่งผลเหมือนกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบ
 ที่ใช้ คือ พลาสมิด pCAM1304-EPSPS และไม่พบแถบสีดำในตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและน้ำ

กลั่น (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเป็นยีน *aroA* จริงและอาจสามารถสอดแทรกเข้าไปรวมตัวกับจีโนมของมันสำปะหลังได้ แต่จะสังเกตได้จากภาพจะพบแถบสีดำขึ้นอีกหนึ่งแถบเหนือแถบดำขนาด 1,600 bp ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นครอบคลุมตั้งแต่ promoter gene จนถึงสิ้นสุดที่ reporter gene ซึ่งในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด pCAM1304-EPSPS อาจมี promoter gene และ reporter gene ที่เหมือนกันแต่ขนาดของตัวยีนต่างกัน จึงทำให้เกิดแถบดำขึ้น 2 แถบ



ภาพที่ 6 ลักษณะแถบสีดำที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่ได้จากปฏิกิริยา Southern PCR hybridization กับดีเอ็นเอของแคลลัสที่รอดชีวิตได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ยีน *aroA* เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ

- M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (บริษัท Fermentas)
- N = น้ำ (negative control)
- C = ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)
- P = พลาสมิด pCAM1304-EPSPS
- 1-8 = ดีเอ็นเอของแคลลัสมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีน

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังโดยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* โดยวิธี dot blot hybridization ทำโดยการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากแคลลัสมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีน *aroA* และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน หยดจีโนมดี

เอ็นเอปริมาณ 4 ไมโครกรัม ลงบนไนลอนเมมเบรน จากนั้นนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* โดยทำการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aroA* ที่ติดฉลากด้วยสารไวรัลยีน digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำไนลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม x-ray หากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจะให้ผลเป็นจุดสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม

การตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAM1304-EPSPS เป็น positive control จากการทดลองพบแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aroA* ในตัวอย่างเซลล์ 4 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่าง และให้ผลเหมือนกับดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) ซึ่งแสดงว่ามียีน *aroA* เข้าไปรวมกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังอย่างถาวร ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม (ภาพที่ 7)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยพบว่าตัวอย่างที่ 1-4 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization ก็ปรากฏจุดสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มเช่นกัน แสดงว่าเซลล์ของมันสำปะหลังเหล่านี้ได้รับยีน *aroA* เข้าไปและรวมตัวกับจีโนมของมันสำปะหลังได้อย่างถาวร



ภาพที่ 7 ลักษณะจุดสีดำที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม X-ray ที่ได้จากปฏิกิริยา dot blot hybridization กับดีเอ็นเอของเซลล์ที่รอดชีวิตได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ยีน *aroA* เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ

N = น้ำ (negative control)

C = ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P = พลาสมิด pCAM1304-EPSPS

1-8 = ดีเอ็นเอของเซลล์มันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การทดสอบสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีผลต่อเซลล์ของมันสำปะหลัง พบว่า ทั้งความเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกับการไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสมคือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* จากการถ่ายยีนไม่ให้เจริญเติบโตได้และไม่มีผลในทางลบต่อการเจริญและพัฒนาของแคลลัสมันสำปะหลัง

การเติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังตาย พบว่า ความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทตั้งแต่ 5 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป จะทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังตายทั้งหมด โดยใช้เวลา 4 สัปดาห์ ดังนั้น ความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ใช้ในการคัดเลือกมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชนี้ คือ 5 มิลลิโมลาร์

ปัจจัยบางประการที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนให้มันสำปะหลังโดยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304-EPSPS และยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท คือ การปลูกเชื่อนาน 60 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน โดยให้ผลการถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผลแบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay ที่เวลา 7 วันหลังการถ่ายยีนดีที่สุด แต่เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าการแสดงออกของยีนรายงานผลลดลงและ พบว่าการปลูกเชื่อนาน 30 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน กลับได้ผลการตรวจสอบสูงกว่า ดังนั้นการปลูกเชื่อนาน 30 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วันจะให้ประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนรายงานผลแบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay ดีที่สุด และการใช้เทคนิคการถ่ายยีนดังกล่าวสามารถถ่ายยีนให้กับแคลลัสมันสำปะหลังได้ โดยเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสททั้งโดยวิธีพีซีอาร์ Southern PCR hybridization และ dot blot hybridization ในแคลลัสที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท พบว่าจำนวน 4 ขึ้นจาก 8 ขึ้นของแคลลัสจากตัวอย่างที่คัดเลือกไว้มียีนที่ถ่ายเข้าไปอยู่จริง

ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้ว่าการศึกษาในครั้งนี้จะไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสมันสำปะหลังดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic calli) ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากสำหรับการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตาม งานทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลัง ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการถ่ายยีน และนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการการเพาะปลูกมันสำปะหลัง เมื่อการใช้พืชตัดต่อพันธุกรรมได้รับการอนุญาตให้เผยแพร่ได้ในสภาพแปลง โดยจะต้องมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดต้นอย่างมีประสิทธิภาพภายหลังการถ่ายยีนให้แก่มันสำปะหลังควบคู่ไปด้วย เช่น การพัฒนาองค์ประกอบของอาหารสูตรชักนำต้นภายหลังการถ่ายยีน หรือการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนและสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีกว่าการใช้แคลลัส หรือผลกระทบทางชีวเคมีภายในมันสำปะหลังหลังได้รับการถ่ายยีน เป็นต้น

การพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทเข้าสู่มันสำปะหลังต่อไปนั้น สูตรอาหารคัดเลือกอาจต้องหาสารคัดเลือกชนิดอื่น เช่น hygromycin แทนไกลโฟเสทในการคัดเลือกระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะเป็นไปได้ว่าสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทอาจส่งผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในมันสำปะหลังจนไม่สามารถชักนำเป็นต้นได้ เมื่อได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ซึ่งเห็นได้จากการตรวจสอบ GUS histochemical assay และ PCR จากการทดลองนี้สามารถถ่ายยีนเข้าไปในแคลลัสมันสำปะหลังได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กัญจนา แซ่เตียว. 2549. การถ่ายยีน *VPI* จากเชื้อไวรัสโรคปากและทำเปื่อยเข้าสู่ถั่วฮามาต้า.

วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉัตรนภา ข่มอาวุธ. 2545. การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเทคนิคที่เหมาะสมในการทำบาดแผล
เพื่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดนัย สุภาพร. 2537. พฤกษศาสตร์และพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง. น.14 และ 22. ใน เอกสาร
วิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ทศพล พรพรม. 2545. สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นิติศรี แสงเดือน และ สัมพันธ์ คัมภีรานนท์. 2548. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยมหาวชิราลงกรณเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2549. สรุปการประเมินความปลอดภัยถั่วเหลือง 40-3-2 ที่ทนทานต่อยาปราบวัชพืช.
แหล่งที่มา. www.biotech.or.th/biosafety/web/db/attach/radD39CC.pdf, 24 กรกฎาคม 2549.

นิรนาม. 2552. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจเกษตรปี 2552. แหล่งที่มา. <http://www.oae.go.th> , 3
สิงหาคม 2553.

นิรนาม. 2553. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช. แหล่งที่มา. www.rdi.ku.ac.th/GMOs/GMOs2/2_1/index4.htm ,
10 กันยายน 2553.

นุชจิ ทัดเศษ. 2552. การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้
Agrobacterium tumefaciens. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รักษนก โคโต. 2549. การถ่ายยีน *CPACO antisense* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์
ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสี เจริญสถาพร, อมรรักษ์ คัดใจเดียว และ โอภาส บุญเส็ง. 2551. การสร้างมันสำปะหลังเตตรา
พลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ผลงานวิจัยได้จริงจากห้องห้ำหึ่ง ครั้งที่ 2,
กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุมนา เหลืองจิติกานุจนา. 2550. การถ่ายยีน *VP1* ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่ยารูซี่
โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2543. เทคนิคการถ่ายยีนกับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, น. 109-111. ใน
เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13: เทคโนโลยี
ใหม่พืชใหม่. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

_____ และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร, ใน เอกสาร
ประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

วิจารณ์ วิชชุกิจ. 2546. งานวิจัย มันสำปะหลัง “ห้วยบง 60”. แหล่งที่มา
www.siweb.dss.go.th/webnew/listenew.asp, 30 มิถุนายน 2549.

อุไรวรรณ วิจารณ์กุล. 2545. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏ
พิบูลสงคราม, พิษณุโลก

Aldemita, R.R. and T.K. Hodges, 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of
japonica and *indica* rice varieties. **Planta** 199: 612-617.

- Almeida, W.A.B., F.A.A.M. Filho, B.M.J. Mendes, A. Pavan and A.P.M. Rodriguez. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* L. and *Citrus limonia* epicotyls segments. **Scientia Agricola**. 60: 23-29.
- Alsheikh, M.K., H.P. Suso, M. Robson, N.H. Battey and A. Wetten. 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens*. **Plant Cell Rept.** 20: 1173-1180.
- Anuradha, T.S., S.K. Jami, R.S. Datla and P.B. Kirti. 2006. Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using cotyledonary node as explants and promoterless *gus*: *nptII* fusion gene base vector. **J. Biosci.** 31: 235-246.
- Aoki, T., A. Kamizawa and S. Ayabe. 2002. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. **Plant Cell Rept.** 21:238-243.
- Arnaud, L. and A. Sailland. 1998. Physiological behavior of two tobacco lines expressing EPSP synthase resistant to glyphosate. **Pesticide Biochem. Physiol.** 62: 27–39.
- Caboni, E., M.G. Tonelli, P. Lauri, S.D. Aneli and C. Damiano. 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 59: 1-7.
- Cao, X., Q. Liu, L.J. Rowland and F.A. Hammerschlag. 1998. Gus expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. **Plant Cell Rept.** 18: 266-270.
- 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 Rep.** 18: 271-278.

- Cooper, G.M. 2000. **The Cell: A Molecular Approach**. Sinauer Associates, Inc., U.S.A. 689 p.
- 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 Rept.** 18: 554-560.
- Danilova, S.A. and Y.I. Dolgikh. 2005. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* transformation of maize embryogenic callus. **J. Plant Physiol.** 52: 535-541.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 12: 13-15.
- Finer, K.R. and J.J. Finer. 2000. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation treated soybean cotyledons. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 406-410.
- Gao, Z., X. Xie, Y. Ling, S. Muthukrishnan and G. H. Liang. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. **Plant Biol.** 3: 591-599.
- Godwin, I.D., T. Gordon, B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. 1991. The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Rept.** 9: 671-675.
- Hankoua, B.B., N.J. Taylor, S.Y.C. Ng, I. Fawole, J. Puonti-Kaerlas, C. Padmanabhan, J.S. Yadav, C.M. Fauquet, A.G.O. Dixon and V.N. Fondong. 2006. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. **Afr. J. Biotechnol.** 5(19): 1700-1712.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumasiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant J.** 6: 271-282.

- Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Mol. Biol.** 35: 205-218.
- Hood, E.E., S.B. Gelvin, L.S. Melchers and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Res.** 2: 208-218.
- Hooykass, P.J.J. and R.A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Mol. Biol. Rep.** 19: 15-30.
- Humara, J.M., M. López and R.J. Ordás. 1999. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. **Plant Cell Rep.** 19: 51-58.
- Jacobsen, H.J. 1993. Biotechnology in grain legumes. Current state and critical remarks. **Grain Legumes.** 2: 12-13.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric gene in plant : the *gus* gene fusion system. **Plant Mol. Biol. Rep.** 5: 378-405.
- Ke, X.Y., A.C. McCormac, A. Harvey, D. Lonsdale, D.F. Chen and M.C. Elliott. 2002. Manipulation of discriminatory T-DNA delivery by *Agrobacterium* embryos of barley and wheat. **Euphytica** 126: 333-343.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and T. Kumashiro. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant J.** 10: 165-174.
- Kondo, T., H. Hasegawa and M. Suzuki. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Plant Cell Rep.** 19:989-993.

- Lee, S.H., D.G. Lee, H.S. Woo, K.W. Lee, D.H. Kim, S.S. Kwak, J.S. Kim, H. Kim, K. Ahsan, H.S. Choi, J.K. Yang and B.H. Lee. 2006. Production of transgenic orchardgrass *via* *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissue. **Plant Sci.** 171: 408-414.
- Leihner, D. 2002. Agronomy and cropping systems, pp. 91–113. *In* R.J. Hillocks and J.M. Thresh (Eds.) **Cassava: Biology, Production and Utilization**, CABI, Oxon.
- Li, H-Q, J-Y. Guo, Y-W. Huang, C-Y. Liang, H.-X. Liu, I. Potrykus and J. Puonti-Kaerlas. 1998. Regeneration of cassava plants *via* shoot organogenesis. **Plant Cell Rep.** 17: 410–414.
- Liau, C. H., S.J. You, V. Prasad, H.H. Hsiao, J.C. Lu, N.S. Yang and M.T. Chan. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an Oncidium orchid. **Plant Cell Rep.** 21: 993-998.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 18: 100-127.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mathais, R.J. and L.A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell). **Plant Sci.** 46: 217-223.
- Melchers, L.S., A.J.G. Regenburg-Tuink, R.A. Schilpeoot and P.J.J. Hooykaas. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. **Mol. Microbiol.** 3: 969-977.

Miki, B. and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Biotech.** 107: 193-232.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 437-497.

Nandakumar, R., L. Chen and S.M.D. Rogers. 2004. Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 79: 31-38.

Owens, L.D. and A.C. Smigocki. 1988. Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds. **Plant Physiol.** 88: 570-573.

Potrykus, I. 1990a. Gene transfer to cereals: an assessment. **Bio/technology** 8: 535-542.

_____. 1990b. Gene transfer to plant: assessment and perspectives. **Physiol Plant.** 79: 125-134.

_____ and G. Spangenberg. 1995. **Gene Transfer to Plants**. Springer-Verlag, Berlin. 361 p.

Raemakers, C.J.J.M., M. Amati, G. Staritsky, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 1993. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Ann. Bot.** 71: 289-294.

de la Riva, G.A., J.G. Cabrelas, R.V. Pradon and C.A. Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. **E.J. Biotech.** 1: 1-16.

Robert, M.L., M.R. Flores and V.M. Loyola-vasgas. 1989. Growth promoting activity of certain penicillin on cultivated cells of *Bouvardia ternifolia*. **Phytochemistry** 28: 2659-2662.

- Saharan, V., C.Y. Ram, T. Neelam and R. Khushi. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa* L.). **Afr. J. Biotechnol.** 3: 572-575.
- Sairam, R.V., M. Parani, G. Franklin, Z. Lifeng, B. Smith, J. MacDougall, C. Wilber, H. Sheikhi, N. Kashikar, K. Meeker, D. Al-Abed, K. Berry, R. Vierling and S.L. Goldman. 2003. Shoot meristem: an ideal explants for *Zea may* L. transformation. **Genome** 46: 323-329.
- Sheikholeslam, S.N. and D.P. Weeks. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Mol. Biol.** 8: 291-298.
- Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence protein, will travel. **Plant cell.** 1699-1710.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Sci.** 35: 301-309.
- Somleva, M.N., Z. Tomaszewski and B.V. Conger. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Switchgrass. **Crop Sci.** 42: 2080-2087.
- Stachel, S.E., E. Messens, V.M. Montagu and P. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature** 318: 624-629.
- Stamp, J.A. and G.G. Henshaw. 1987. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava. **Ann. Bot.** 59: 445-450.
- Szabados, L., R. Hoyos and W.M. Roca. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Rep.** 6: 248-251.

- Taylor, N., P. Chavarriaga, K. Raemakers, D. Siritunga and P. Zhang. 2004. Development and application of transgenic technologies in cassava. **Plant Mol. Biol.** 56: 671–688.
- Tsuyoshi, Y., M. Teraishi, K. Hattori and M. Ishimoto. 2001. Transformation azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 64: 47-54.
- Vasil, I.K. 1994. Molecular improvement of cereals. **Plant Mol. Biol. Rep.** 25: 925-957.
- Widholm, J.M., A.R. Chinnala, J.H. Ryu, H.S. Song, T. Eggett and J.E. Brotherton. 2001. Glyphosate selection of gene amplification in suspension cultures of 3 plant species. **Physiol. Plant.** 112: 540-545.
- Wu, H., C. Sparks, B. Amoah and H.D. Jones. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. **Plant Cell Rep.** 21: 659-668.
- Yan, B., M.S.S. Reddy, G.B. Collins and R.D. Dinkins. 2000. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) using immature zygotic cotyledon explants. **Plant Cell Rep.** 19: 1090-1097.
- 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 Hort.** 109: 75-85.
- Zhang, S., L.H. Zhu, X.Y. Li, A. Ahlman and M. Welander. 2005. Infection by *Agrobacterium tumefaciens* increased the resistance of leaf explants to selection agents in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinensis*). **Plant Sci.** 168: 137-144.
- Zhong, H., B. Sun, D. Warkentin, S. Zhang, R. Wu, T. Wu and M. B. Sticklen. 1996. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. **Plant Physiol.** 110: 1097-1107.



ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

ธาตุอาหาร	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutrients	
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
KH_2PO_4	170.000
Micronutrients	
H_3BO_3	6.200
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.930
KI	0.830
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-EDTA solution	
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.850
Organic compounds	
Glycine	2.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine.HCl	0.500
Thiamine.HCl	0.100
Myo-inositol	100.000
Other	
Sucrose	30,000.000
pH 5.6-5.8	

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani media (LB) (Maniatis *et al.*, 1982)
สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

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

ตารางผนวกที่ 3 องค์ประกอบของอาหาร SOB (Maniatis *et al.*, 1982) สำหรับเลี้ยงเชื้อ
แบคทีเรียสำหรับเพื่อทำ competent cell ของ *Escherichia coli* และเลี้ยงเชื้อ
Agrobacterium tumefaciens

สารเคมี	กรัมต่อลิตร
Bacto tryptone	10.0
Bacto yeast extract	5.0
NaCl	0.1
pH 7.0	
agar	15.0

ตารางผนวกที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS Histochemical assay
(Jefferson *et al.*, 1987)

เตรียมสารละลาย X-Gluc substrate โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) (บริษัท Fermentas) ปริมาณ 0.144 กรัม ละลายในสารละลาย dimethylformamide ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) นำสารละลายดังกล่าวมาผสมรวมกัน เขย่าส่วนผสมนี้ให้เข้ากัน แล้วนำเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบมาบ่มร่วมกับสารละลายดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วดูดสารละลายทิ้งเติมเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเปลี่ยนเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ใหม่ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกว่าเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบจะไม่มีสีเขียว แล้วนำเนื้อเยื่อไปตรวจสอบการเกิดจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลาย	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.0 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	0.1 M	100.0
5.0 mM K ₃ Fe(CN) ₆	0.5 mM	100.0
5.0 mM K ₄ Fe(CN) ₆	0.5 mM	100.0
0.25 M Na ₂ EDTA (pH 7.0)	10 mM	40.0
0.02 M X-gluc substrate	1.0 mM	50.0
10% Trion X-100	1.0%	10.0
dH ₂ O		600.0

ตารางผนวกที่ 5 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมของพืชโดยดัดแปลงจากวิธี
CTAB (Doyle and Dopyle, 1990)

สารเคมี	กรัมต่อลิตร
Extraction buffer	
CTAB	2%
PVP	2%
NaCl	1.4 M
EDTA, pH 8.0	20 mM
Tris-HCl, pH 8.0	100 mM
α -mercaptoethanol	0.2% (v/v)
TE buffer	
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

ตารางผนวกที่ 6 การเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction ; PCR) ของยีน *aroA*

ความเข้มข้นของสารประกอบ ปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปฏิกิริยาที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10 X PCR buffer	1 X	2.0
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	2.0
1 mM dNTP mix	250 μ M	5.0
5 μ M Primer epeps-F	0.125 μ M	0.5
5 μ M Primer epeps-R	0.125 μ M	0.5
5U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.5U	0.1
50-100 ng DNA template		2.0
dH ₂ O		7.9
Total volume		20

การทำปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermocycler (Biometra®) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Predenatureing	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
Denaturing	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Anealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extention	72 องศาเซลเซียส	90 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
	16 องศาเซลเซียส	∞	

ตารางผนวกที่ 7 การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10X สำหรับเทคนิค agarose gel electrophoresis

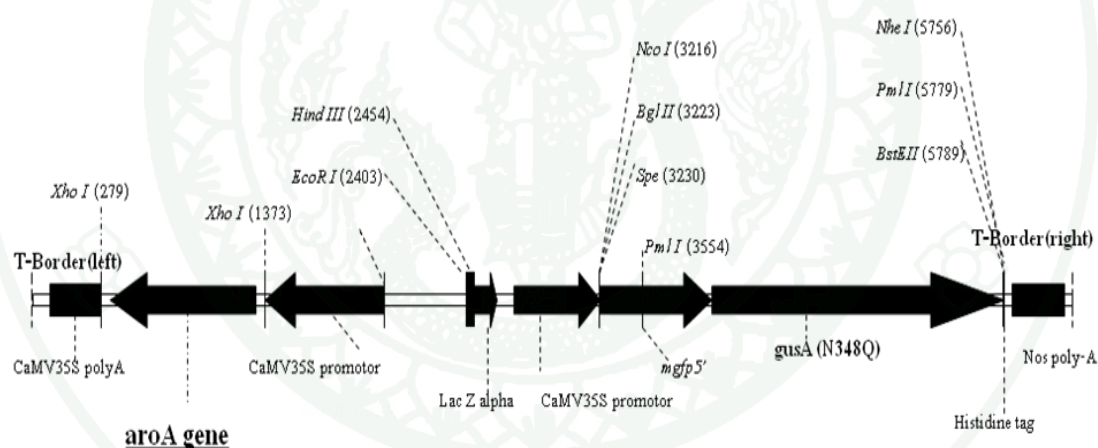
ส่วนประกอบ	กรัมต่อลิตร
Tris-base	54
Glacial acetic acid	27.5
0.5M EDTA:pH 8.0	20 มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำดีไอออนในซ้ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว จนปริมาตรครบ 1 ลิตร	

ตารางผนวกที่ 8 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization และ Southern blot hybridization

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
Hybridization buffer	
SSC	5X
N-lauroylsarcosine	0.1%
SDS	0.02%
Blocking solution (1:10 dilution of stock 10X blocking solution)	1X
High stringency buffer	
SSC	2X
SDS	0.1%
Low stringency buffer	
SSC	0.1X
SDS	0.1%
Washing buffer	
Maleic acid buffer	1X
Tween 20	0.3%
Maleic acid buffer	
Maleic acid	0.1M

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
NaCl	0.15M
ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย NaOH	
Blocking Solution	0.1M
Dilute 10X blocking solution 1:10 with	0.1M
Maleic acid buffer	
Detection buffer	
tris-HCl	
NaCl	
ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย NaOH	



ภาพผนวกที่ 1 แผนที่ของพลาสมิด pCAM1304-EPSPS จาก left border ถึง right border ขนาด 6,128 คู่เบส ซึ่งส่วนของ T-DNA ที่มียีน *aroA* บรรจุอยู่ภายใน

ภาคผนวกที่ 1 การสกัดพลาสมิดโดยวิธีของ QIAprep Purification of Plasmid DNA
Miniprep (บริษัท QIAGEN)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pCAM1304-EPSPS ในอาหาร LB broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทอาหาร LB broth ที่งอกถ่ายทิ้งและล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 (resuspension buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RnaseA 100 μ g/ml) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง แล้วย้ายเซลล์แขวนลอยเชื้อลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ P2 (Lysis buffer : 200 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ N3 (Neutralization buffer : 3 M potassium acetate pH 5.5) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนใสด้านล่างลงใน QIAprep spin column จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติimbuffเฟอร์ PB (Equilibration buffer : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% TritonX-100) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที นำส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติimbuffเฟอร์ PE (1 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เพื่อล้าง QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด ย้าย QIAprep spin column วางลงบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติimbuffเฟอร์ EB (10 mM Tris-HCl pH8.0) หรือน้ำ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ได้พลาสมิดในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ด้านล่าง

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียม competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหาร SOB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยขึ้นมา 400 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.2-0.4 นำเซลล์แขวนลอยเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เย็น แล้วแช่หลอดในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อเบา ๆ ด้วยสารละลาย RF1 (10 mM KCl, 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 mM potassium acetate, 10 mM $CaCl_2$, 15% glycerol และปรับ pH 5.8) ปริมาตร 1/3 เท่าของปริมาตรอาหาร SOB แล้วแช่หลอดในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อเบา ๆ ด้วยสารละลาย RF2 (10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2$, 15% glycerol และปรับ pH 6.8) ปริมาตร 1/25 เท่าของปริมาตรอาหาร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เย็น หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-6 ชั่วโมงก่อนใช้ ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ในการเตรียม competent cell ต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียม competent cell ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 บนอาหารแข็งสูตร LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ดูเชื้อปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมนลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารแขวนลอยเชื้อแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วแบ่งสารแขวนลอยเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด ละลายตะกอนเชื้อเบา ๆ ด้วยสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรหลอดละ 25 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด หลังจากนั้นละลายตะกอนเชื้อเบา ๆ ด้วยสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยลดปริมาตรลงหลอดละ 12.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด ทำเช่นเดิม โดยลดปริมาตรของสารละลายกลีเซอรอลที่ใช้ละลายตะกอนเชื้อให้เหลือเพียง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และแช่เย็น แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการถ่ายยีนโดยวิธี electroporation ต่อไป

ภาคผนวกที่ 4 การเตรียม competent cell ของ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์

EHA105

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็งสูตร LB นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน คูดเชื้อปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมนลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารแขวนลอยเชื้อแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วแบ่งสารแขวนลอยเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรหลอดละ 25 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด หลังจากนั้นละลายตะกอนเชื้อเบา ๆ ด้วยสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยลดปริมาตรลงหลอดละ 12.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด ทำเช่นเดียวกันอีกครั้ง โดยลดปริมาตรของสารละลายกลีเซอรอลที่ใช้ละลายตะกอนเชื้อให้เหลือเพียงหลอด 0.5 มิลลิลิตร และแช่เย็น แบ่งในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการถ่ายยีนโดย electroporation ต่อไป

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล

นายกุลชาติ นาคจันทิก

วัน เดือน ปี ที่เกิด

5 มิถุนายน 2526

สถานที่เกิด

จังหวัดชลบุรี

ประวัติการศึกษา

จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2549

สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และ

เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

