



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

พืชไร่นา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายยีนต้านทานสารไกลโฟเสทเข้าสู่อ้อย

(*Saccharum officinarum* L.)

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Sugarcane

(*Saccharum officinarum* L.)

นามผู้วิจัย นางสาวกุสุมา รอดแผ้วพาล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์นงลักษณ์ เทียนเสรี, ปร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์นวรรตน์ อุดมประเสริฐ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนต้านทานสารไกลโฟเสทเข้าสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.)

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Sugarcane
(*Saccharum officinarum* L.)

โดย

นางสาวกฤษมา รอดแผ้วพาล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุสุมา รอดแผ้วพาล 2554: การถ่ายยีนต้านทานสารไกลโคฟอสเฟตเข้าสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.
68 หน้า

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ได้แก่ ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อ การเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและแคลลัสอ้อย พบว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นในช่วง 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นต้นอ้อย และ การทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยทดสอบความเข้มข้นของเชื้อ โดยการเจือจาง เซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่าง ๆ และระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนแคลลัสอ้อย ตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS histochemical assay พบว่า การปลูกเชื้อโดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่ไม่เจือจาง (สัดส่วน 1:0 ของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียต่ออาหารเพาะเลี้ยง) ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่คิดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 88.33 % และ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการอื่นที่ทดสอบ

การถ่ายยีน EPSPs เข้าสู่แคลลัสของอ้อยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นพาหะ โดยนำเทคนิคที่ได้จากการศึกษาต้นเบื้องต้นมาใช้ในการถ่ายยีน พบว่า มีแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโคฟอสเฟต 0.5 มิลลิโมลาร์ จำนวน 10 โคลน จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตมาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่า มียีน EPSPs จำนวน 5 โคลน เมื่อนำมายืนยันผลการมีอยู่ของยีน EPSPs ที่ถูกถ่ายยีนเข้าไปในแคลลัสด้วยวิธี Southern PCR blot และ dot blot hybridization พบว่า มี EPSPs อยู่ในจีโนมของอ้อยจริง

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Kusuma Rodpeawpan 2011: Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 68 pages.

The study of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency were done including the concentration of cefotaxime on growth of *Agrobacterium tumefaciens* and sugarcane callus. It was found that cefotaxime at the concentration of 200 milligram per liter could inhibit growth of *A. tumefaciens* strain EHA 105. Cefotaxime at the concentrations of 100-500 milligram per liter did not affect on growth of the callus and regeneration into plantlet. Another tested factor was the dilution of bacterial suspension combine with various inoculation duration. Transformation efficiency was determined by measuring transient expression of *uidA* (*gus*) gene in transformed callus using GUS histochemical assay. It was found that the bacterial suspension in the dilution ratio of 1:0 (bacterial suspension: liquid medium) in concerted with 10 minutes inoculation period gave the highest percentage of blue staining pieces, 88.33 % and significantly different from other treatments.

Transformation of *EPSPs* gene into calli of sugarcane using *Agrobacterium* strain EHA105 harboring pCAM-EPSPs 1304 plasmid by the technique studied earlier was done. 10 clones of callus survived on the selective medium containing 0.5 mM glyphosate but only 5 of them showed PCR positive for *EPSPs*. The results of Southern PCR hybridization and dot blot hybridization also confirmed the presence of *EPSPs* gene into plant genome.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบ พระคุณ รศ.ดร. สนธิชัย จันท์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนให้ความรู้อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือด้านการเรียนและด้านอื่น ๆ อย่างเอาใจใส่ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. พรศิริ เลียงสกุล ประธานการสอบ และ ผศ.ดร. กัญญา แซ่เตียว ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สกอ. ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การทดลอง

ขอขอบพระคุณ พี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อน ห้องปฏิบัติห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ พ่อ แม่และน้องสาว ที่ให้ความรัก คำปรึกษา กำลังใจ และให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษามาโดยตลอด

กุสุมา รอดแผ้วพาล
กันยายน 2554

สารบัญ

| | หน้า |
|-----------------------------|------|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (3) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 18 |
| อุปกรณ์ | 18 |
| วิธีการ | 20 |
| ผลและวิจารณ์ | 32 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 55 |
| สรุป | 55 |
| ข้อเสนอแนะ | 56 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 57 |
| ภาคผนวก | 66 |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน | 68 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay บนแคลลัสอ้อย พันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ซึ่งภายในบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อและระยะเวลาในการปลูกเชื้อต่าง ๆ | 44 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 ตำแหน่งที่ถูกยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวน โดยสาร ไกลโฟเสท | 14 |
| 2 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304 | 19 |
| 3 เทคนิคการให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน จากการตรวจสอบการแสดงออก ของยีน <i>gus</i> แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay | 25 |
| 4 การตรวจวิเคราะห์เวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304 ด้วยการย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xho</i> และ <i>EcoRI</i> แลบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส เป็นแลบดีเอ็นเอของยีน <i>EPSPs</i> | 33 |
| 5 การตรวจวิเคราะห์ยีน <i>EPSPs</i> ที่อยู่ในเวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304 ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>EPSPs</i> | 34 |
| 6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนพันธุ์ก้ามแสด 94-13 | 37 |
| 7 การเจริญเติบโตของแคลลัสอ่อนพันธุ์ก้ามแสด 94-13 เมื่อเพาะเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10 % ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์ | 39 |
| 8 การเจริญเติบโตของแคลลัสอ่อนพันธุ์ก้ามแสด 94-13 เมื่อเพาะเลี้ยงบน อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10 % เพื่อ ชักนำต้น นาน 9 สัปดาห์ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10 % ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์ | 40 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 9 | การเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียบบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ภายหลังจาก spread plate นาน 1 สัปดาห์ | 41 |
| 10 | ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียบโดยใช้เวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304 | 49 |
| 11 | ผลการตรวจสอบการเข้าร่วมตัวของยีน <i>EPSPs</i> กับจีโนมแคลัสอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียบ สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ก) และ Southern/PCR blot (ข) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>EPSPs</i> ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส โดยทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน <i>EPSPs</i> | 53 |
| 12 | การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>EPSPs</i> อย่างถาวรด้วยเทคนิค dot blot hybridization ในแคลัสที่คาดว่ายีนได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียบเป็นพาหะ | 54 |

การถ่ายยีนต้านทานสารไกลโฟเสทเข้าสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.)

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)

คำนำ

อ้อยจัดเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งของโลก สำหรับในประเทศไทย ผลผลิตอ้อยถูกนำเข้าสู่โรงงานเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลในรูปแบบต่าง ๆ นอกเหนือจากการบริโภคภายในประเทศแล้วยังสามารถส่งออกไปต่างประเทศและนำรายได้เข้าสู่ประเทศมีมูลค่าประมาณ 2,180 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2553) นอกจากการผลิตเป็นน้ำตาลแล้วส่วนที่เหลือยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ได้อีกมากมาย ในการเพาะปลูกปี 2552/53 มีพื้นที่เพาะปลูก 7.13 ล้านไร่ ผลผลิต 72.85 ล้านตัน และผลผลิตเฉลี่ย 10.21 ตันต่อไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2553)

เห็นได้ว่าผลผลิตยังอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งการปลูกอ้อยให้ได้ผลผลิตต่อไร่สูงขึ้นนั้น อาจทำได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการเลือกพันธุ์อ้อย การจัดการไร่ที่ดี และ วัชพืช ซึ่งเป็นศัตรูอ้อยที่สำคัญที่ทำให้ความเสียหายแก่ผลผลิตอ้อยมากที่สุด หลังจากปลูกอ้อยถ้าไม่มีการป้องกันกำจัดวัชพืช จะทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงถึง 80 % (พรชัย, 2551) หรือมากกว่านั้น ความเสียหายขึ้นอยู่กับปริมาณวัชพืชที่ขึ้นเบียดบังอ้อย ว่ามีมากน้อยเพียงไร และความสามารถในการแข่งขันกับวัชพืชของอ้อยแต่ละพันธุ์ วัชพืชจะแก่งแย่งธาตุอาหารในดิน ความชื้น และแสงแดดที่อ้อยควรจะได้รับ ทำให้อ้อยมีการแตกกอและความยาวของลำอ้อยลดลง อีกทั้งยังเป็นที่อยู่อาศัยของศัตรูอ้อยชนิดอื่นได้แก่ โรคที่เกิดจากทั้งไวรัส และไฟโตพลาสมา แมลงพาหะนำโรค แมลงศัตรูอ้อย และหนู นอกจากนี้ วัชพืชบางชนิดมีรากหรือส่วนของดินใต้ดินที่ขั้วสารบางอย่าง ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย เช่น หญ้าคา และวัชพืชใบกว้างในวงศ์ Compositae รากจะขั้วสารพิษชนิดหนึ่ง ซึ่งไปทำให้รากของอ้อยชะงักการเจริญเติบโต พบว่า วัชพืช *Aeginetia indica* เป็น root parasite ที่แย่งอาหารและน้ำจากอ้อย ทำให้เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครสในอ้อยลดลงจาก 13.08 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 5.09 เปอร์เซ็นต์ (กรมวิชาการเกษตร, 2008)

แม้ว่าอ้อยจะเป็นพืชไร่ชนิดหนึ่งที่มีความทนทานต่อการใช้สารกำจัดวัชพืช แต่สารกำจัดวัชพืชที่ใช้หลังออกส่วนใหญ่มักเป็นแบบไม่เลือกทำลาย ทำให้เมื่อสารสัมผัสกับต้นอ้อยที่ยังเล็กจะทำให้อ้อยชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้อ้อยมีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช จะช่วยทำให้การกำจัดวัชพืชของเกษตรกรมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ส่งผลให้ต้นทุนที่ใช้ในการผลิตอ้อยลดลง และทำให้ผลผลิตของอ้อยเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย แต่เนื่องจากในธรรมชาติไม่สามารถหาพันธุ์อ้อยที่สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ ดังนั้น วิธีการถ่ายยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชเข้าสู่อ้อยนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาอ้อยให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้



วัตถุประสงค์

ทราบวิธีการถ่ายโอนที่เหมาะสมโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมและถ่ายโอนด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทเข้าสู่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13



การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของอ้อย

อ้อย (sugarcane) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* L. จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae เช่นเดียวกับ ข้าว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง พันธุ์อ้อยที่ใช้ปลูกเป็นการค้ามีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันไป ตั้งแต่ $2n = 100-130$ อ้อยมีระบบรากฝอย มีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ โดยใช้ส่วนของลำต้นตัดเป็นท่อน ลำต้นมีสีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ใบเป็นแบบ simple leaf เรียงสลับกันบนลำต้น บางพันธุ์อาจเกิดเวียนรอบลำต้น อ้อยมีช่อดอกแบบ panicle เรียกทั่วไปว่า arrow ผลและเมล็ดเป็นแบบ caryopsis แต่โดยปกติเมล็ดอ้อยมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน นอกจากเก็บไว้ในสภาพที่เหมาะสม (อุดม, 2541; ประเสริฐ, 2547)

การปลูกอ้อยในประเทศไทยมีผู้นิยมปลูกกันแพร่หลาย โดยดินที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของอ้อย คือ ดินร่วนถึงร่วนเหนียว มีการระบายน้ำดี มีอินทรีย์วัตถุในดินไม่น้อยกว่า 1.5 % และมีระดับความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 6.0-7.5 (ประเสริฐ, 2547; กรมวิชาการเกษตร, 2008)

อ้อยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน โดยประโยชน์ทางตรง คือ การนำไปผลิตเป็นน้ำตาลทราย ซึ่งน้ำตาลทรายที่ผลิตได้แบ่งเป็น น้ำตาลทรายดิบ (ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลทรายขาว และขาวบริสุทธิ์) น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจะมีผลพลอยได้เกิดขึ้นมากมาย เช่น กากอ้อย (เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้า ทำ particle board เพื่อนำไปผลิตเฟอร์นิเจอร์) กากน้ำตาล (ใช้ผลิตสุรา เบียร์ ซีอิ๊ว แอลกอฮอล์) filter cake (ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ) ปัจจุบันมีการนำอ้อยมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในรูปเอทานอล นอกจากนี้ ยังสามารถนำผลพลอยได้ไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีกมาก ทั้งในด้านเครื่องสำอาง ยารักษาโรค และอุตสาหกรรมพลาสติก (ประเสริฐ, 2547; กรมวิชาการเกษตร, 2008)

พันธุ์อ้อยที่นิยมปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติที่คล้ายกัน คือ ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพความหวานมากกว่า 10 ซีซีเอส เจริญเติบโตดีเหมาะกับสภาพดินฟ้าอากาศ ไร่ต่อไร่ไม่น้อยกว่า 2 ครั้ง และให้ผลผลิตไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของอ้อยปลูก ด้านทานต่อโรคเหี่ยวเนาแดง แส้ดำ กอตะไคร้ ทนทานต่อหนอนกอหลายจุดใหญ่ หรือหนอนกอหลายจุดเล็ก (กรมวิชาการ

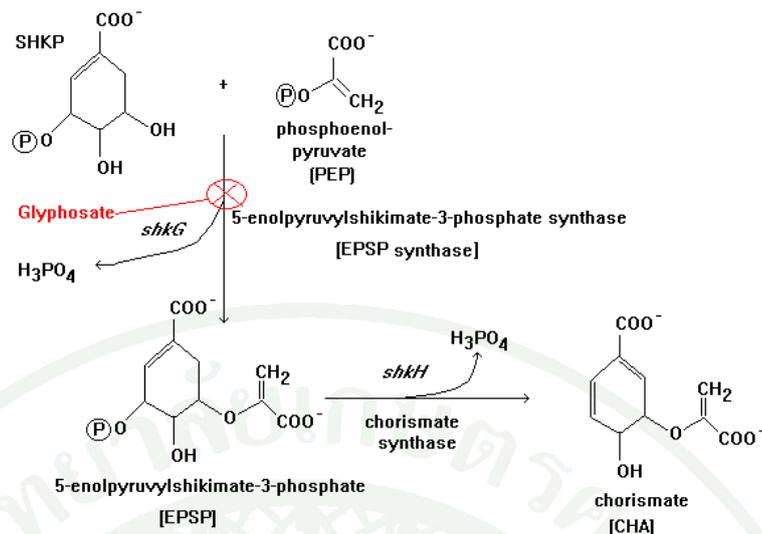
เกษตร, 2008) พันธุ์อ้อยที่นิยมปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ พันธุ์ K 76-4, K 84-69, K 84-200, K 88-65, K 88-87, K 88-92, K 90-54, K 90-77, K 92-80, K 92-213, K 93-219, K 93-347, LK 92-11, LK 92-92, อุ้มทอง 1 และ อุ้มทอง 3 นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ใหม่น่าสนใจ คือ พันธุ์ K 95-84, K 95-156, K95-161, K95-283, 91-2-056, 94-2-483, กำแพงแสน 94-13 และ มก.60-1 (รณยุทธ, ม.ป.ป.)

ลักษณะประจำพันธุ์ของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 คือ เป็นลูกผสมเปิดของ พันธุ์ 89-1-20 ให้ผลผลิต 15-18 ตัน/ไร่ ความหวาน 12-14 ซีซีเอส แดกกอปานกลาง (4-6 ลำ/กอ หรือ 11,000 ลำ/ไร่) ขนาดลำใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.8-3.2 เซนติเมตร) ลำสีเขียวปนเหลือง ทรงกระบอก เนื้อใสดัน ไร่โตดี งอกเร็ว เจริญเติบโตเร็วมาก หักล้มปานกลาง ทนแล้งดี กาบใบร่วง หลุดง่าย ออกดอกเล็กน้อย ไม่มีขน ใบเขียวปนเหลือง ใหญ่ยาว โค้ง ดินที่เหมาะสม คือ ดินร่วน ดินร่วนทราย อ่อนแอต่อโรคใบจุดเหลือง โรคใบจุดวงแหวนและโรคราสนิม ด้านทานปานกลาง ต่อโรคเส้ดำ ด้านทานปานกลางต่อหนอนเจาะลำต้น (รณยุทธ, ม.ป.ป.)

สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

ไกลโฟเสทเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1972 และเริ่มนำมาใช้ ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน (aromatic amino acid) ได้แก่ tryptophan tyrosine และ phenylalanine (ทศพล, 2545)

เมื่อ shikimate-3-phosphate และ PEP ทำปฏิกิริยากันได้ EPSP โดยการทำงานของเอนไซม์ EPSPs จนกระทั่งได้ chorismate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารต่างๆ รวมทั้งกรดอะมิโนที่เป็นวงแหวน แต่เมื่อพืชได้รับสารไกลโฟเสทจะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการสะสม shikimic acid ในเนื้อเยื่อพืช และจะไม่เกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน (ทศพล, 2545; รังสิต, 2547)



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งที่ถูกยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวน โดยสารไกลโฟเสท

ที่มา: www.hort.purdue.edu/.../aromat/ar00007.htm

สารไกลโฟเสทเป็นสารประเภทไม่เลือกทำลายใช้แบบหลังงอก (post-emergence) ใช้กำจัดวัชพืชฤดูเดียวและข้ามปี ทั้งใบแคบและใบกว้าง แต่วัชพืชที่เป็นเถาเลื้อยก่อนข้างจะทนทาน และเนื่องจากเป็นสารที่ไม่เลือกทำลายจึงต้องระมัดระวังในการฉีดพ่น โดยไม่ให้ละอองสารปลิวไปสู่ใบพืชปลูก สารสามารถซึมเข้าทางใบหรือส่วนที่มีสีเขียวอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดี ภายหลังจากฉีดพ่น สารออกฤทธิ์จะเคลื่อนย้ายหรือถูกดูดซึมเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหาร ไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช (ทศพล, 2545; รังสิต, 2547) วัชพืชวงศ์หญาที่อ่อนแอต่อสารไกลโฟเสท เมื่อได้รับสารนี้การเจริญเติบโตจะหยุดชะงักทันที ใบจะเหลืองและแห้งตายภายใน 3-7 วัน แต่สำหรับวัชพืชที่ค่อนข้างทนทานต่อสาร อาการเหลืองจะเกิดขึ้นที่จุดเจริญและใบอ่อนก่อน และอาการจะค่อย ๆ ปรากฏภายใน 7-10 วัน (รังสิต, 2547)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย เริ่มต้นที่ฮาวายในปี ค.ศ. 1961 (Nickell, 1964) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาราโนไมมาจากลำต้นอ้อยพันธุ์ H50-7209 เพื่อให้เกิดแคลลัส เมื่อนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยแล้วแยกเซลล์แขวนลอยเดี่ยว ๆ มาเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นแคลลัส ปรากฏว่าแคลลัสเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งการเจริญเติบโตและ

จำนวนโครโมโซม (Heinz and Mee, 1969) ในเวลาต่อมาจึงทราบว่าเซลล์ของอ้อยดังกล่าว ประกอบด้วยเซลล์ที่มีความแปรปรวนในจำนวนโครโมโซม และพบว่าอ้อยพันธุ์ H50-7209 แต่ละต้นประกอบด้วยเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน เรียกว่า chromosome mosaic ซึ่งการค้นพบดังกล่าวเป็นจุดเริ่มต้นของความพยายามที่จะนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้ในการสร้างสายพันธุ์ (subclones) เพื่อปรับปรุงลักษณะของอ้อย (Nickell, 1977)

Heinz and Mee (1969) รายงานว่า สามารถชักนำเนื้อเยื่ออ้อยให้เกิดแคลลัสได้ภายใน 2-4 สัปดาห์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Modified Murashige and Skoog (MS) ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และฮอร์โมน 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะไม่มีการพัฒนาเป็นยอดหรือราก ส่วนการกระตุ้นให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ ทำได้โดยการย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี 2,4-D (ไพบูลย์และคณะ, 2524; Kharinarin *et al.*, 1996; Cuellar, 1997) โดยกระบวนการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นจะมีโอกาสทำให้ต้นอ้อยเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้ (Larkin and Scowcroft, 1983)

กรีกและคณะ (2534) ทดลองเพาะเลี้ยงปลายยอดอ้อยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ในสัดส่วนต่าง ๆ วางหลอดทดลองในเครื่องเขย่าชนิด gyratory shaker ที่หมุนด้วยอัตราเร็ว 2 รอบต่อวินาทีและได้รับแสงตลอดเวลา พบว่า อาหารเหลวที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำปลายยอดอ้อยให้เจริญแตกตาข้างและเริ่มแตกหน่อเล็ก ๆ 4-5 ยอดต่อชิ้นปลายยอด เมื่อหน่ออ้อยอายุ 50 วัน จะถูกตัดแยกไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ต้นอ้อยแข็งแรง จากนั้นชักนำให้เกิดรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายในเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Gill *et al.* (2006) เพาะเลี้ยงส่วนใบอ่อนของอ้อยบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA, Kinetin และ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อ้อยทั้ง 3 พันธุ์ สามารถพัฒนาเป็นยอดโดยไม่ผ่านแคลลัสบนอาหารที่เติม NAA และอ้อยพันธุ์ CoJ83 เกิดยอดมากที่สุด 83.12 % บนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่มีแต่ Kinetin อย่างเดียว ไม่ชักนำให้เกิดยอด ยอดที่ได้จะพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายใน 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตรเดิม ต้นอ้อยที่ได้จะถูกเพาะเลี้ยงจนแข็งแรงและย้ายปลูกลงดิน โดยอ้อยมีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมีการแตกหน่อที่ดี

Tiel *et al.* (2006) ตัดส่วนลำต้นของอ้อยในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกเป็น 5 ชิ้น ยาวขึ้นละประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ชักน้ำให้เกิดแคลลัสบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.5 μM นาน 1 สัปดาห์ ชักน้ำให้เกิดแคลลัสได้ 61.9 % ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ และการเติมผงถ่านจะช่วยลดสารประกอบ phenolic และลดการสะสมของออกซิน ชิ้นส่วนในตำแหน่งที่ 1 และ 2 จากโคนต้น เมื่อชักน้ำให้เกิดแคลลัสแล้วจะพัฒนาให้ยอดจำนวนมากโดยเฉพาะในตำแหน่งที่ 1 ยอดที่เกิดขึ้นสามารถพัฒนารากและใบได้อย่างปกติ เมื่อนำอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไปปลูก พบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปกติ

Basnayake *et al.* (2011) ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับชักน้ำแคลลัส การเพิ่มปริมาณและการชักน้ำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ในอ้อย 16 พันธุ์ พบว่า มี 15 พันธุ์ที่สามารถชักน้ำให้เกิดแคลลัสและชักน้ำแคลลัสให้เกิดขึ้นได้ และปัจจัยที่มีผลต่อการชักน้ำแคลลัส ได้แก่ สภาวะแวดล้อมของการปลูก (ในสภาวะขาดน้ำเมื่อนำอ้อยมาชักน้ำแคลลัสจะได้ปริมาณแคลลัสเพียง 1.5 กรัมต่อชิ้น แต่ถ้าในสภาวะที่มีน้ำสมบูรณ์จะได้แคลลัสมากกว่า 35 กรัมต่อชิ้น) ควรเปลี่ยนอาหารให้เร็วขึ้นเพื่อลดการเกิดและสะสมสารฟีนอลิก (phenolic) ระดับความเข้มข้นระหว่างการชักน้ำให้เกิดต้น ความเข้มข้นของ 2,4-D สำหรับสูตรอาหารชักน้ำให้อ้อยแตกกอ ได้แก่ MSC₀ ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.0225 มิลลิกรัมต่อลิตร

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งพืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับให้มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค และเพื่อศึกษากลไกการทำงานของยีนหรือกระบวนการต่าง ๆ ในทางชีววิทยา โดยเมื่อเปรียบเทียบการปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้วิธีการผสมพันธุ์แบบทั่วไปกับการถ่ายยีนให้กับพืช พบว่า การถ่ายยีนให้กับพืชสามารถผลิตพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ที่ดีได้ สามารถเปลี่ยนแปลงข้อด้อยบางอย่างของพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถเพิ่มคุณค่าหรือคุณสมบัติในด้านที่เป็นประโยชน์ทางการค้าให้แก่พืช (พิสสุวรรณ, 2542)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช มีขั้นตอนที่สำคัญ คือ การโคลนยีนและจัดทำพลาสมิดสำหรับถ่ายยีน การถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์พืชด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับชนิดพืชนั้น การคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน และการพัฒนาเป็นต้นของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีหลายวิธี โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีการใหญ่ ๆ คือ

1. การถ่ายฝากยีนโดยตรง (direct gene transfer)

เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรงด้วยวิธีการต่าง ๆ ซึ่งมีหลายวิธีขึ้นกับความเหมาะสมของชนิดพืช และชนิดเนื้อเยื่อเป้าหมาย วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรงที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) (Chowdhury *et al.*, 1992; Seema *et al.*, 2001) การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic technique) (Bower and Birch, 1992; Chowdhury *et al.*, 1992; Bower *et al.*, 1996; Falco *et al.*, 2000) เป็นต้น ซึ่งการใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นวิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธีที่ยั่งยืนเข้าสู่เซลล์ ยีนที่ใช้จะถูกเคลือบไว้บนอนุภาคโลหะขนาดเล็ก เช่น อนุภาคทองคำ หรืออนุภาคทังสเตน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์โดยใช้แรงผลักดันจาก แหล่งต่าง ๆ เช่น แรงขับจากคินป็น แรงขับจากกระแสไฟฟ้า หรือแรงดันของก๊าซ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวผลักดันอนุภาคโลหะเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ และเกิดการเชื่อมต่อระหว่างยีนที่ต้องการกับโครโมโซมของเซลล์เป้าหมาย วิธีการส่งถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชสำคัญบางชนิด เช่น กลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ไม่ตอบสนองต่อการส่งถ่ายยีนด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium* (พิศสุวรรณ, 2542; สุรินทร์, 2545; อภิชาติ, ม.ป.ป.)

Bower and Birch (1992) ถ่ายยีนเข้าสู่ embryogenic callus ของอ้อยสายพันธุ์ Pindar ด้วยเทคนิค microprojectile bombardment โดยใช้พลาสมิด pEmuGN (ที่มียีน *gus*), pEmuKN (ที่มียีน *nptII*) หรือ p35S*luxF2* (ที่มียีน *hpt*) เมื่อตรวจสอบ transient expression จากแคลลัสที่ผ่านการยิงอนุภาคด้วยพลาสมิด pEmuGN พบว่า ระยะห่างระหว่างหัวยิงกับแท่นวาง ที่ระยะ 17 เซนติเมตร ให้ transient expression มากกว่าที่ระยะ 12.5 เซนติเมตร คัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการยิงอนุภาคด้วยพลาสมิด pEmuKN บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ geneticin เข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแคลลัสที่ผ่านการยิงอนุภาคด้วย p35S*luxF25* ถูกคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากการคัดเลือกแคลลัสบนอาหารคัดเลือกแล้วได้ต้นอ้อยดัดแปลงพันธุกรรม

Chowdhury *et al.* (1992) ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สอัยสายพันธุ์ทางการค้า (CP72-1210) 2 วิธี คือ microprojectile bombardment และ electroporation โดยเซลล์แขวนลอยอ้อยอายุ 3 วันถูกยิงด้วยอนุภาคทองที่เคลือบผิวด้วยพลาสมิด pBARGUS (ภายในพลาสมิดประกอบด้วยยีน *gus* ซึ่งใช้เป็นยีนรายงานผลและยีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก) และใช้พลาสมิดนี้ในการทำ electroporation เข้าสู่เซลล์ไร้ผนัง (protoplasts) ด้วย ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *bar* ในสายพันธุ์ดันทาน โดยการใช้นิเทศ Southern blot analysis พบว่า การถ่ายยีนทั้ง 2 วิธีสามารถสร้างเซลล์แขวนลอยและเซลล์ไร้ผนังที่ดันทานต่อ basta ได้

Falco *et al.* (2000) ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สอัยพันธุ์ SP80-180 โดยใช้พลาสมิด pHA9 ที่มียีน neomycin phosphotransferase (*neo*) และพลาสมิด pATC20 ที่มียีน phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) โดยวิธี particle bombardment พืชที่ผ่านการถ่ายยีนถูกคัดเลือกบนอาหารที่เติม geneticin ความเข้มข้น 43.3 ไมโครโมลาร์ และพืชที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นจะถูกยีนย่นความดันทาน โดยการใส่กระดาษกรองที่จุ่มสารละลาย kanamycin ปิดรอยผ่านบนเส้นใบของอ้อยที่ปลูกในโรงเรือน หลังจากนั้นอ้อยที่ดันทาน kanamycin (136 ต้น) ถูกสเปรย์ด้วย ammonium glufosinate 2 ครั้ง พบอ้อยที่ดันทาน จำนวน 133 ต้น

Khalil (2001) ได้พัฒนาวิธีการสำหรับถ่ายยีนและเพิ่มความถี่ในการเกิดเป็นต้นใหม่ของอ้อยเมื่อผ่านการยิงอนุภาค เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ และการเพาะเลี้ยงในสภาพต่าง ๆ พบว่า การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยให้การผลิต embryonic callus การพัฒนาของ embryo และจำนวนของ embryo มีค่าสูงที่สุด อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MSCS1 (MS salts เติม MS vitamins และน้ำมะพร้าว 5 %) มีความเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง somatic embryo ของอ้อยให้พัฒนาเป็นต้นอ้อย เมื่อนำต้นอ้อยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 7 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงที่สุด การใช้ kanamycin ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงพอสำหรับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและใช้สำหรับการคัดเลือก somatic embryo ที่ผ่านการถ่ายยีน สำหรับค่า osmotic ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนในอ้อย คือ การใช้ 0.2 M sorbitol และ 0.2 M manitol นาน 4 ชั่วโมง ก่อนและหลังการยิงอนุภาค

Xu *et al.* (2008) ได้สร้างระบบ regeneration สำหรับอ้อยพันธุ์ badila และถ่ายยีน RS (ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง resveratrol) โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่า อาหารที่เหมาะสม

สำหรับระบบ regeneration ได้แก่ MS+2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร MS+NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร+BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1/2MS+NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัส differentiation medium และ ชักนำราก ตามลำดับ การเติม activate carbon 0.5 % ในอาหารสูตร differentiation และ ชักนำรากจะช่วยลดความเป็นพิษที่เกิดจากฟีนอลและช่วยส่งเสริมการเกิดราก เมื่อตรวจสอบพืชที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า มี 21 ต้นที่แสดงผลบวก แต่เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot เหลือพืชที่ดัดแปลงพันธุกรรม 7 ต้นที่ให้ผลบวกกับยีนที่ตรวจสอบ

Jing-Sheng *et al.* (2008) ศึกษาการถ่ายยีน *CryIA(c)* เข้าสู่อ้อยโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานต่อ sugarcane borer และใช้ยีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก พบว่าระดับความเข้มข้นของ phosphinothricin (PPT) ที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกแคลลัสหลังการถ่ายยีน คือ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับระยะการออกราก ส่วนการฉีดพ่นต้นอ้อยที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย Basta พบว่า ที่ระดับ 3.0 % (v/v) ต้นอ้อยจะตายหลังการฉีดพ่น 1 สัปดาห์ เมื่อนำดีเอ็นเอจากต้นอ้อยที่ผ่านการถ่ายยีน 207 ต้น มาตรวจสอบด้วย nested PCR พบว่า มี 9 ต้น ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *CryIA(c)* หลังจากนั้นนำทั้ง 9 ต้น มาตรวจสอบด้วย DIG พบว่า มี 2 ต้น ที่ให้ผลบวก จากนั้นนำทั้ง 2 ต้น มาทำ PCR เพื่อหาลำดับเบสแล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *CryIA(c)* พบว่า มีลำดับเบสเหมือนกัน

Lowe *et al.* (2009) ใช้ PDS-1000/He Particle Delivery SystemTM และ electric discharge gun ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโพด โดยใช้ดีเอ็นเอ เคลือบอนุภาคในอัตราส่วนต่าง ๆ คือ 0.25 2.5 และ 25 นาโนกรัมต่อการยิงหนึ่งครั้ง (ใช้อนุภาคทองคำ 0.45 กรัม) พบว่า การใช้ helium gun ทำให้เกิด single copy 46 % และ 29 % เมื่อใช้ดีเอ็นเอ 2.5 และ 25 นาโนกรัมต่อการยิงหนึ่งครั้ง ตามลำดับ การใช้ electric discharge gun ทำให้เกิด single copy 54 % และ 18 % เมื่อใช้ดีเอ็นเอ 2.5 และ 25 นาโนกรัมต่อการยิงหนึ่งครั้ง ตามลำดับ แต่พบว่า ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนลดลงเมื่อลดปริมาณดีเอ็นเอลงจาก 25 นาโนกรัมต่อการยิงหนึ่งครั้ง เหลือ 2.5 นาโนกรัมต่อการยิงหนึ่งครั้ง โดยการยิง helium gun ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนลดลงจาก 41 % เป็น 34 % และจาก 48 % เป็น 31 % เมื่อใช้ electric discharge gun

2. การถ่ายฝากยีนโดยใช้พาหะ

เป็นวิธีการถ่ายยีนที่ใช้พาหะหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นนำเอาชิ้นยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช เป้าหมาย ได้แก่ การใช้เชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัส โดยพาหะที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ การถ่ายฝากยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium mediated gene transfer*)

อะโกรแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้ บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดปุ่มปม (tumour) หรือที่เรียกว่า crown gall disease บริเวณลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด จากความสามารถในการส่งถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดโรคที่อยู่บนดีเอ็นเอพิเศษที่มีลักษณะเป็นวงแหวนขนาดเล็กภายในเซลล์ที่เรียกว่า Ti พลาสมิด (Tumour inducing plasmid) เข้าสู่เซลล์พืชบริเวณบาดแผล ชิ้นดีเอ็นเอจะเข้าเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมพืช ทำให้เซลล์พืชเกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษากลไกการถ่ายยีนเหล่านี้และพบว่าสามารถแทนที่ชิ้นที่ก่อโรคด้วยยีนควบคุมลักษณะที่ต้องการแล้วให้อะโกรแบคทีเรียทำการส่งถ่ายเข้าสู่พืช เพื่อให้เกิดการแสดงออกในลักษณะตามที่ต้องการ (นุชจรี, 2552; อภิชาติ, ม.ป.ป.)

Arencibia *et al.* (1998) ประสิทธิภาพสำเร็จในการสร้างอ้อยตัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ EHA101 พบว่า ปัจจัยหลักที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน คือ อายุของแคลลัส การชักนำหรือการพัฒนาในระดับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *A. tumefaciens* พร้อมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์อ้อยและการทำ pre-induction ของแคลลัสจะช่วยเพิ่มความเหมาะสมของเซลล์สำหรับการส่งถ่าย T-DNA แต่พวกเขาไม่ได้เปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งมีความสำคัญมากต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนในอ้อยพันธุ์ต่าง ๆ

Liu *et al.* (2003) ศึกษาประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนทั้งแบบชั่วคราวและแบบถาวรในอ้อยที่ควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย RUBQ2 promoter ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคและใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่า เมื่อถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และการใช้ RUBQ2 promoter ส่งเสริมให้มีระดับการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวในใบและในแคลลัสอ้อยสูงกว่าการใช้ 35S promoter สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ (LBA4404 และ AGL1) พบว่าสายพันธุ์ LBA4404 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย RUBQ2 และ Ubi1 promoter ทำให้แคลลัสมากกว่า 95 % ติดสีน้ำเงินในขณะที่ 35S promoter ไม่ปรากฏการติดสีน้ำเงินและมีกิจกรรมของยีน *gus* มากกว่าสายพันธุ์ AGL1 โดยการยิงอนุภาคมีระดับการแสดงออกของยีน

แบบชั่วคราวมากกว่าการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ส่วนการแสดงผลออกของยีนแบบถาวรพบว่า แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยยีน *gus* ที่มี RUBQ2 promoter แสดงสีน้ำเงินเข้ม รองลงมา คือ Ubi1 และ 35S ตามลำดับ

Wu *et al.* (2003) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนในข้าวสาลีโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ได้แก่ ขนาดของเอ็มบริโอ, ระยะเวลา pre-culture, inoculation, co-cultivation, การเติม *acetosyringone* และการเติม silwet-L77 พบว่า เอ็มบริโอขนาดมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร และเอ็มบริโอขนาดมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์การติดสีน้ำเงินมากกว่าขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร การเติม *acetosyringone* ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวสาลีที่ทดสอบทั้ง 4 พันธุ์ การเติมสาร silwet-L77 ที่ความเข้มข้น 0-0.1 % มีอัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาของแคลลัสสูงแต่การเติม silwet-L77 ที่ความเข้มข้นสูงแคลลัสจะติดสีน้ำเงินสูงกว่าการเติม silwet-L77 ความเข้มข้นต่ำ การ pre-culture น้อยกว่า 1 ชั่วโมงทำให้อัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอต่ำ แต่มีอัตราการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* สูง เมื่อเพิ่มระยะเวลา inoculation จะเพิ่มการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* แต่จะทำให้อัตราการรอดชีวิตและการเกิดเป็นต้นใหม่ลดลง และการเพิ่มระยะเวลา co-cultivation จะลดความสามารถในการเกิดเป็นต้นใหม่ ดังนั้นวิธีการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับข้าวสาลีพันธุ์ Florida คือ การ pre-culture 0.5-1 ชั่วโมง ระยะเวลาในการ inoculation 3 ชั่วโมง และ co-cultivation 3 วัน โดยพันธุ์ Florida และ Caderza มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนระหว่าง 0.3 % ถึง 3.3 %

Manickavasagam *et al.* (2004) ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ถ่ายยีน *bar* เข้าสู่ตาข้างของอ้อย โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ kanamycin, gentamicin กับสาร phosphinothricin (PPT) ในการคัดเลือกตาข้างที่ผ่านการถ่ายยีน พบว่า PPT มีประสิทธิภาพมากในการคัดเลือก และประสิทธิภาพการถ่ายยีนขึ้นกับ ระยะเวลาในการทำ co-cultivation (ที่เหมาะสม คือ 3 วัน) การเติมสาร *acetosyringone* (ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน) และ สายพันธุ์เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (สายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพมากในการถ่ายยีน) เมื่อมีการสเปรย์ BASTA (60 กรัมต่อลิตร glufosinate) ลงบนอ้อย คัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกในโรงเรือน พบว่า 50-60 % ของต้นพืชไม่เกิดความเสียหาย

Samiphak and Siwarungson (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ แคลลัสข้าวหอมดอกมะลิ105 โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มี pCAMBIA5305 พบว่า การ infection 15 นาที ร่วมกับการ co-cultivation 3 วัน มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าการ infection 10 นาที ร่วมกับการ co-cultivation 2 วัน 16 % และ 10 % ตามลำดับ แต่การ co-cultivation 3 วันทำให้ความสามารถในการเกิดต้นลดลง 4 เท่า เมื่อเทียบกับการ co-cultivation 2 วัน การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ทุกตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน GFP สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA5303hva1 พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายยีนเท่ากับ 2.7 % เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hva1* จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *hva1* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hva1* จากเนื้อเยื่อที่คัดเลือกบนอาหารที่เติมกลูโคส 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Verma *et al.* (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ของ *A. tumefaciens* (สายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105) ภายในบรรจุ pCAMBIA1304) กับเนื้อเยื่อข้าวฟ่าง 3 ชนิด (ปลายยอด ใบ และแคลลัส) และ สาร acetosyringone พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสาร acetosyringone ในอาหารเพาะเลี้ยง อะโกรแบคทีเรียจะเพิ่มความสามารถของเชื้อในการเกาะกับเซลล์พืช และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แสดงการตอบสนองสูงที่สุด เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว พบว่า การเพิ่มสาร acetosyringone ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียจะเพิ่มขนาดและความหนาแน่นของการแสดงออกของยีน *gus* และแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีน

Hossain *et al.* (2009) ได้ศึกษาวิธีการถ่ายยีนที่เหมาะสม สำหรับ mature embryo ของข้าวหอม 4 พันธุ์ ได้แก่ Kalizira, Radhunipagol, Tulsimala และ Pusa Basmati-1 ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ภายในบรรจุพลาสมิด pIG121-Hm ซึ่งมียีน *udiA* เป็นยีนรายงานผลและยีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือก พบว่า ข้าวพันธุ์ Kalizira ให้เปอร์เซ็นต์ GUS positive สูงสุด คือ 70 % เมื่อใช้ระยะเวลาปลูกเชื้อนาน 25 นาที และ co-cultivation นาน 3 วัน และ พบว่า Kalizira ให้เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอดหลังการถ่ายยีนสูงสุด คือ 33.33 % รองลงมา คือ Pusa Basmati 1 (20.0 %) และ Radhunipagol และ Tulsimala ตามลำดับ นอกจากนี้พันธุ์ Kalizira ยังมีอัตราการอยู่รอดสูงสุดเมื่อ ปลูกใน growth chamber และ ในสภาพแปลง

แม้ว่าจะมีวิธีการถ่ายยีนมากมายหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated transformation) และการถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic technique) เพื่อส่งถ่ายยีนยีนเป้าหมายเข้าสู่เซลล์พืชและคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ยีนคัดเลือก (selectable marker gene) โดยทั่วไปแล้วจะเป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืช ทำให้เซลล์พืชที่มียีนเหล่านี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารคัดเลือกได้ (พิศสุวรรณ, 2542; ภัทรพร, 2549)

การพัฒนาพืชต้านทานไกลโฟเสท

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้มีความสามารถในการต้านทานต่อสารไกลโฟเสทนั้นสามารถทำได้หลายวิธีไม่ว่าจะเป็นการคัดเลือกพืชต้านทานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น Zambrano *et al.* (2003) ศึกษาผลของสารไกลโฟเสทต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.8 mM พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยได้ประมาณ 50 % จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวที่เติมสารไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.8 mM (cell suspension tolerant [TS]) และเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารไกลโฟเสท (cell suspension sensible [SS]) นำ TS และ SS ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารไกลโฟเสท ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า TS สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสท มากกว่า SS 12.5 เท่า เมื่อนำต้นอ้อยจาก TS และ SS มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสท พบว่า ต้นอ้อย (TR₁) ที่เจริญมาจาก TS สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสทมากกว่าต้นอ้อย (SR₁) ที่เจริญมาจาก SS 6 เท่า จากนั้น เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากใบของต้นอ้อย TR₁ (TSR₁) และจากใบของต้นอ้อย SR₁ (SSR₁) พบว่า เซลล์แขวนลอยจาก TSR₁ ทนทานต่อความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทมากกว่าเซลล์แขวนลอยจาก SSR₁ 5 เท่า และเมื่อใช้เทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPA-07 ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 564 คู่เบส ใน tolerant cellular line แต่ไม่ปรากฏใน sensitive cellular line

การดัดแปลงให้พืชสร้างเอนไซม์ EPSPS เพิ่มขึ้น โดยใช้ strong promoter หรือการถ่ายยีนยีนจากแบคทีเรีย *Agrobacterium* CP4 ซึ่งจะมีเอนไซม์ EPSPS อีกรูปแบบหนึ่ง โดยเอนไซม์ CP4-EPSPS ไม่ถูกยับยั้งโดยสารไกลโฟเสท หรือการเปลี่ยนลำดับเบสในยีน 1 ตำแหน่งจากเบส C ไปเป็นเบส G ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Gly เป็น Ala ทำให้สารไกลโฟเสทไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ ส่งผลให้พืชสามารถสร้างกรดอะมิโนที่เป็นวงแหวนได้ตามปกติ ทำให้พืชสามารถมีชีวิตรอดต่อไปได้ (Mulwa *et al.* 2006; Sundar *et al.* 2008)

Howe *et al.* (2002) ได้พัฒนาระบบการคัดเลือกโดยใช้ยีนเครื่องหมายให้มีประสิทธิภาพ สำหรับการสร้างข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้ยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท เป็นยีนคัดเลือก ในการทดลองได้โคลนยีน *EPSPs* จากข้าวโพด และทำให้ยีน *EPSPs* กลายพันธุ์ จากนั้นนำยีน *EPSPs* ที่กลายพันธุ์ใส่ไปใน pMON8631 และ pMON19640 และนำยีนจาก แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทำให้สารไกลโฟเสทเสียสภาพ (ยีน *GOX*) ใส่ใน pMON19643 จากนั้น ถ่ายยีนต้านทานต่อสารไกลโฟเสทเข้าสู่ข้าวโพดโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสท พบว่า ข้าวโพดสามารถเจริญเติบโตได้บน อาหารที่เติมสารไกลโฟเสทและทนทานต่อสาร Roundup® การทดสอบการกระจายตัวของ ลักษณะต้านทานต่อสารไกลโฟเสทในรุ่นลูกโดยใช้เมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองและผสมข้าม ของต้นที่ถูกพ่นด้วย Roundup® และไม่ได้ถูกพ่น พบว่า มี 4 จาก 8 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสม ตัวเองมีการกระจายตัวของพันธุกรรมของลักษณะต้านทานต่ออ่อนแอในอัตราส่วน 3:1 และมี 3 จาก 8 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสมข้ามมีอัตราส่วนการกระจายตัวเท่ากับ 1:1

Wang *et al.* (2003) ศึกษาการแสดงออกของยีน *aroA-MI* (เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *aroA* และยีน *EcoroA*) ในต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 เป็นพาหะ พบว่า โคลนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และมียีน *aroA-MI* สามารถมีชีวิตรอดบนอาหารที่เติมไกลโฟเสท 0.08 mM ถึง 80 % เปรียบเทียบกับ โคลนที่มียีน *EcoroA* มีเพียง 15 % ที่สามารถมีชีวิตรอดบนอาหารที่เติมสารไกลโฟเสท 0.05 mM ในขณะที่ ยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีความอ่อนไหวต่อสารไกลโฟเสทและไม่สามารถมีชีวิตรอดบน อาหารที่เติมสารไกลโฟเสท 0.05 mM คัดเลือกยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมและเพาะเลี้ยงในสภาพ โรงเรือนเพื่อทดสอบความต้านทานต่อสารไกลโฟเสท โดยสเปรย์ Roundup® ในอัตราที่แนะนำ คือ 1.8 กรัมต่อลิตร พบว่า หลังการฉีดครั้งแรก 1 สัปดาห์ ยาสูบที่ได้รับยีน *aroA-MI* ไม่ได้รับความเสียหาย สามารถแตกใบใหม่ แต่ยาสูบที่ได้รับยีน *EcoroA* ได้รับความเสียหายหลังจากการ สเปรย์หนึ่งครั้ง ในขณะที่ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมดหลังจากการสเปรย์ครั้งแรก 5 วัน เมื่อนำเมล็ดยาสูบรุ่น T_1 บนอาหาร MS ที่เติมสารไกลโฟเสท 0.5 mM พบว่า เมล็ดยาสูบที่มียีน *aroA-MI* มีความเสถียรและมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ด wild type ตรวจสอบการแทรกตัวในนิวเคลียส ของรุ่น T_1 8 โคลน ด้วยเทคนิคฟิชเชอร์ พบแถบดีเอ็นเอ ของยีน *aroA-MI* และ *EcoroA* จากทั้ง 8 โคลน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในพืช ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 มีการสร้าง mRNA

Roudsari *et al.* (2009) ศึกษาการถ่ายยีนในพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ samsun โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีน คือ การใช้อนุภาคทองคำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ไมโครเมตร rupture disk ขนาด 900 psi ความดัน vacuum 24 inches Hg และระยะระหว่าง stopping screen กับ target tissue 6 เซนติเมตร จากนั้นสร้างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อสารไกลโฟเสท โดยแทนที่ยีน *aadA* ด้วยยีน *EPSPs* ในพลาสต์ชนิด pKCZ โดยในขั้นตอนการคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมแบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 คัดเลือกหลังการถ่ายยีน 2 วัน ใช้ไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิโมลาร์ เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้ไกลโฟเสทความเข้มข้นเดิม และวิธีที่ 2 คัดเลือกหลังการถ่ายยีน 1 สัปดาห์ บนอาหารที่เติมไกลโฟเสท ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ โดยเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสท 2 เท่า พบว่า วิธีคัดเลือกวิธีที่ 1 ชี้นพืชมีความอ่อนแอต่อไกลโฟเสทและตายภายใน 1 เดือน และไม่มีการสร้างแคลลัส ส่วนการคัดเลือกวิธีที่ 2 พบการสร้างแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่เติมไกลโฟเสท 50 ไมโครโมลาร์ และแคลลัสเหล่านี้มีความทนทานต่อไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ แต่การเกิดเป็นต้นใหม่ไม่สมบูรณ์ โดยต้นพืชไม่สามารถสร้างรากได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์อ้อย

อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วย
ชั้นวางเนื้อเยื่อพร้อมระบบไฟให้ความสว่างและเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
ค้ำมีดและใบมีดผ่าตัด ปากกิบ จานแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

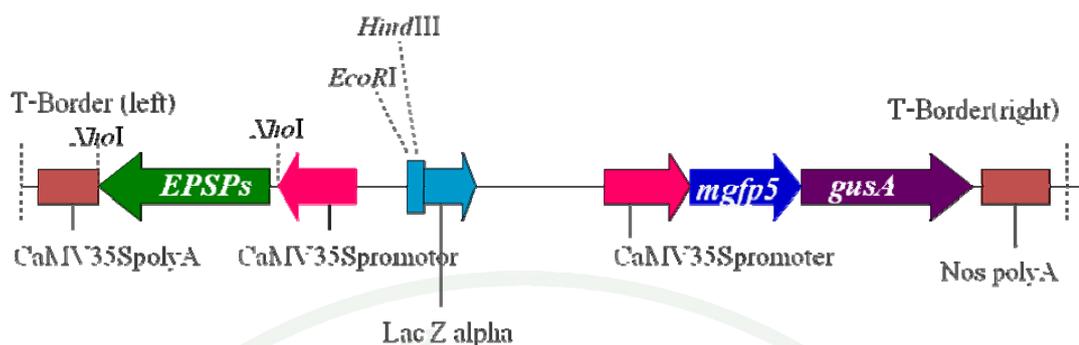
2.3 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารสูตร MS รวมทั้งฮอร์โมนที่ใช้
ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงแต่ละขั้นตอน

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตัดต่อยีนและถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.1 เชื้อแบคทีเรียสำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด ได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

3.2 เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105
สำหรับใช้ถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.3 พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (ภาพที่ 2) ประกอบด้วย CaMV-35S promoter และ
CaMV-35S polyA ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน EPSPs CaMV-35S promoter และ Nos poly-A ที่
ควบคุมการแสดงออกของยีน *gusA* และ *mgfp5* (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุบิน หินจันทร์)



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบต่างๆ ของเวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดต่อยีน ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (low speed centrifuge) เครื่องผสมสาร (vortex) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) เครื่อง Gel Documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจลชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการตัดต่อยีน ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตร Luria Bertani (LB) สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เอนไซม์ไลเกส (ligase)

4. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนคัดเลือก EPSPs

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

TTA ACA ACA TGG C-3'

EPSPs (reverse): 5'-ATC CAC CGC TCG AGC GGT CAT CAG

GCA GCC TTC GTA T-3'

วิธีการ

1. การนำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* และ *A. tumefaciens*

1.1 การนำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock

นำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมีขนาดประมาณ 12,867 คู่เบส เข้าสู่ competent cell ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดนี้ โดยเติมพลาสมิดสายผสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี competent cell 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ บ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วจุ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที รีบนำกลับมาบ่มในน้ำแข็งอีก 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเก่าทิ้ง เติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ได้มา ถูบนผิวหน้าอาหารสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

1.2 การตรวจสอบโคลินี่ที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม

สุ่มโคลินี่ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียด้วย QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN) โดยนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง เติม buffer P1 (resuspension buffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RnaseA 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน เติม buffer P2 (lysis buffer: 200 mM NaOH, 1 % SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา เติม buffer N3 (neutralisation buffer: 3 M Potassium acetate pH 5.5) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายส่วนใสด้านบนลงใน QIAprep spin column ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติม buffer PB (Equilibration buffer: 750mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol, 0.15 % TritonX-100) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้ง

ทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติม buffer PE (1 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง ย้าย column มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่
- 20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยการย่อยดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ *XhoI* ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

1.3 การนำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยวิธีอิเล็กโตรโพรเซชัน (electroporation)

นำ competent cell ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ปริมาตร 120 ไมโครลิตร มาแช่น้ำแข็งให้เย็นจัด เติมพลาสมิดสายผสม 5 ไมโครลิตร (400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วเติมลงใน cuvette แช่ในน้ำแข็ง 20 นาที ใช้สภาวะการถ่ายยีนเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียตามคำแนะนำของบริษัท Bio-Rad โดยใช้เครื่อง Gene Pulser โดยใช้ค่าตัวแปรต่าง ๆ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) 2.5 กิโลโวลต์ ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) 25 ไมโครฟารัด และค่าความต้านทาน (resistance) 400 โอห์ม เช็ด cuvette ให้แห้งแล้วใส่ในช่องสำหรับผ่านกระแสไฟฟ้า กดปุ่ม pulse ที่หน้าจอจะปรากฏเลข 9 ซึ่งแสดงว่าได้ผ่านกระแสไฟฟ้าแล้ว จากนั้นดึง cuvette ออก ใช้ไมโครปิเปตย้ายเซลล์ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่มีอาหารเหลว LB 1 มิลลิตร นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดอาหาร LB ทิ้งโดยให้เหลืออยู่ในหลอดประมาณ 300 ไมโครลิตร กวนตะกอนเซลล์ให้กระจาย จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาณ 100 และ 200 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ตรวจสอบชุดยีน EPSPs จากโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีน EPSPs ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis ก่อนจะนำเซลล์เลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนและการชักนำเพื่อให้เกิดต้นที่สมบูรณ์

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อน

นำปลายยอดอ่อนพันธุ์กำแพงแสน 94-13 อายุ 6-7 เดือน มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย สารละลายไฮเตอร์ 10 % และ 5 % เดิม Tween 20 1-2 หยด เขย่านาน 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ล้าง ด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกกาบใบออกจนเหลือใบม้วนชั้นในสุด ตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชูโครส 20 กรัมต่อ ลิตร และน้ำมะพร้าว 10 % โดยปริมาตร pH 5.7 (สูตรชักนำแคลลัส) เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 15 วัน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (ปีتما, 2546)

2.2 การชักนำให้เกิดต้น

แยกแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจาก ฮอร์โมน เดิมชูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 % โดยปริมาตร pH 5.7 (สูตรชักนำ ต้น) เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหาร ทุก 15-20 วัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 2 สัปดาห์ ประมาณ 6 สัปดาห์จะได้ต้นจำนวนมาก (ปีتما, 2546)

2.3 การชักนำให้เกิดราก

นำต้นอ่อนที่แข็งแรงมาแยกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ตัดใบออก เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เดิมชูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน สังเกตจำนวนรากที่เกิดขึ้น โดยใช้ ขวดเพาะเลี้ยงทรงสูงขนาดใหญ่ หรือใช้ ขวด 8 ออนซ์ ใส่อาหารเพาะเลี้ยงประมาณ 75 มิลลิตรต่อขวด (ปีتما, 2546)

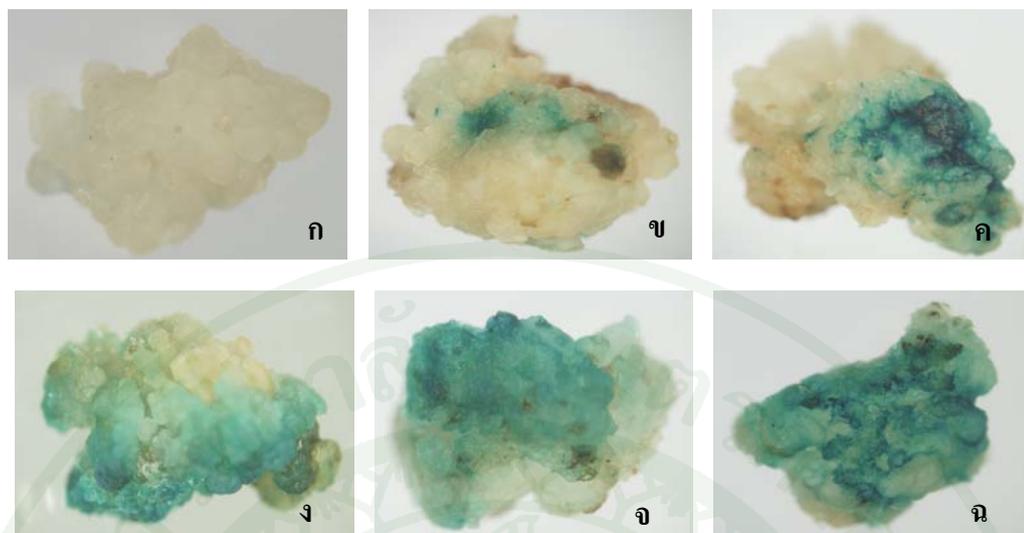
3. การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสอ่อนและเชื้ออะโกราแบคทีเรียม

3.1 การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสอ่อน

ตัดแคลลัสอ่อนให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร วางบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำแคลลัส ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้แคลลัส 15 ชิ้นในการทดลองแต่ละความเข้มข้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) ทำ 3 ซ้ำ เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและตรวจผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้น เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลการเกิดต้น

3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกราแบคทีเรียม

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกราแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1 มิลลิลิตร ($OD_{600} \sim 0.8-1$) ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 1 มิลลิลิตร แล้วกวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 50 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกราแบคทีเรียม ทุก 7 วัน จนครบ 14 วัน



ภาพที่ 3 เกณฑ์การให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay

- ก. 0 คะแนน ไม่เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืช
- ข. 1 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 1-20 เปอร์เซ็นต์
- ค. 3 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 21-40 เปอร์เซ็นต์
- ง. 5 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 41-60 เปอร์เซ็นต์
- จ. 7 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 61-80 เปอร์เซ็นต์
- ฉ. 9 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 81-100 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษาความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อย

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ($OD_{600} \sim 0.8-1$) เติลง ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน เซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติอาหารเหลวสูตรซั๊ก นำแคลลัสเท่าปริมาตรเดิม แล้วกวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยไปเจือจางในอาหารเพาะเลี้ยงอ้อยในสัดส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 และ 1:100 จากนั้นเลือก ชิ้นส่วนแคลลัสที่เป็น compact callus ใช้ปากกิบีบเบา ๆ ให้แคลลัสแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีเซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่าง ๆ ร่วมกับสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ปิดฝาเขย่าเบา ๆ นาน 10 20 30 และ 40 นาที ให้ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับเชื้ออย่างทั่วถึง ซับแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นแคลลัสด้วยกระดาษซับที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรซั๊กนำแคลลัส ที่เติมสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีเวลานาน 3 วัน ล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตรซั๊กนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่านาน 30 นาที จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรซั๊กนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) มี 3 ซ้ำ โดยใช้เนื้อเยื่อซั๊กละ 20 ชิ้น บันทึกเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินและให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนแคลลัส (โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับคะแนน คือ 1 3 5 7 และ 9 โดยแต่ละช่วงคะแนนจะกำหนดให้มีพื้นที่ติดสีน้ำเงิน 1-20, 21-40, 41-60, 61-80 และ 81-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ภาพที่ 3) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ด้วย Least significant difference (LSD)

5. การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่แคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13

หลังจากได้ทำการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ แล้วจึงได้นำผลการทดสอบมาใช้ในการถ่ายยีนซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

5.1 การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ($OD_{600} \sim 0.8-1$) เติมนลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมน้ำอาหารเหลวสูตรซัคนำแคลลัส 20 มิลลิลิตร (ไม่เจอจากเชื้อ) กวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย แล้วเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

5.2 การถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่เป็น compact callus ใช้ปากคีบบีบเบา ๆ ให้แคลลัสแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:0 ร่วมกับสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ปิดฝาเขย่า นาน 10 นาที ให้ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับเชื้ออย่างทั่วถึง ซับแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นแคลลัสด้วยกระดาษซับที่นิ่งมาเชื้อแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรซัคนำแคลลัส ที่เติมสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 3 วัน ล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตรซัคนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่านาน 30 นาที จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรซัคนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรซัคนำต้นที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารไกลโฟเสท 0.5 มิลลิโมลาร์ เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จนแคลลัสพัฒนาเป็นต้น จากนั้นเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นเดี่ยวที่สมบูรณ์ต่อไป

6. การตรวจวิเคราะห์อ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน

คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนและมีชีวิตรอด ภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก นาน 1 เดือน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์, Southern PCR hybridization และ dot blot hybridization

6.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

6.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสอ้อย

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแคลลัสอ้อยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้วิธี CTAB ซึ่งคัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) บดแคลลัสให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ตักแคลลัสที่บดจนละเอียดใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวซ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย extraction buffer (2 % CTAB, 2 % PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 % (v/v) α -mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนทริฟิวซ์หลอดใหม่ เติมสารผสม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex นาน 5 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนทริฟิวซ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นาน 5 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ เติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของ ปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่มีเอนไซม์ RNaseA 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA maker) บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที ใน 1X TBE buffer เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต่อไป

6.1.2 การตรวจวิเคราะห์แคลัสต์อ้อยที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

(polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *EPSPs* ปฏิกริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 1 mM dNTP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์แต่ละชนิด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) และดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลัสต์อ้อย 2 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation รอบแรกที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกริยาพีซีอาร์ จำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ สำหรับ denaturation, annealing และ extension เป็น 94, 56 และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, 1 นาที และ 90 วินาที ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิ สำหรับ extension รอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

6.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในแคลัสต์อ้อยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

6.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สำหรับทำปฏิกริยา hybridization ด้วยเทคนิค PCR Labeling

ใช้พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้พลาสมิดปริมาณ 2 ไมโครลิตร และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน *EPSPs* และติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบด้วย PCR DIG Labeling kit (บริษัท Roche Applied Science) ใช้อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับปฏิกริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบยีน ในข้อที่ 6.1.2

6.2.2 การเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในจีโนมของแคลัสอ้อย โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

หลังจากการตรวจสอบผลการมีอยู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และแยกแถบดีเอ็นเอด้วย อิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจดูแผ่นเจลด้วย UV-transilluminator แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย depurination (0.25 M HCl) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่ผ่านการ ึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH และ 1.5 M NaCl) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอน นี้อีกครั้ง แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCl; pH 7.5 และ 1.5 M NaCl) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติสารละลายทิ้ง แล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกรอบ ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาบนไนลอนเมมเบรนโดยวาง กระดาษ Whatman 3 MM ใช้เป็นสะพานในอ่างที่มีสารละลาย 10X SSC (0.3 M sodium citrate และ 3 M NaCl) นำเจลที่ได้จากขั้นตอนด้านบนมาแช่ในสารละลาย 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.5 Na-citrate; pH 7.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลวางคว่ำหน้าลง บนกระดาษ Whatman 3 MM จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล วางทับด้วยกระดาษ 3MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลาย ๆ ชั้นให้มีความหนา 20 เซนติเมตร จากนั้น วางวัตถุที่มีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม ทับบนกระดาษซับอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 18 ชั่วโมงเพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลขึ้นมาติดอยู่บนไนลอนเมมเบรน จากนั้นลอก ไนลอนเมมเบรนออกจากเจลแล้วนำมาแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 3 นาที ผึ่งไนลอนเมมเบรน ให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอน เมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยา hybridization ต่อไป

6.2.3 การทำปฏิกิริยา hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 6.2.2 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (5X SSC, 0.1 % N-lauroylsarcosine, 0.02 % SDS และ 1X Blocking solution) โดย เติสารละลาย hybridization ลงในหลอด hybridization ที่ใส่ไนลอนเมมเบรน ใช้ปริมาตร สารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ไนลอนเมมเบรน 10 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศา

เซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากข้อ 6.2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดดังกล่าว แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปเติมลงในหลอด hybridization ที่มีในลอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

6.2.4 การตรวจสอบผลการ hybridization

นำในลอนเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization จากข้อ 6.2.3 มาล้างด้วยสารละลาย low stringency buffer (2x SSC, 0.1 % SDS) โดยเติมสารละลายให้ท่วมในลอนเมมเบรนเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (0.1x SSC, 0.1 % SDS) โดยเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างในลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (1x Maleic acid buffer, 0.3 % Tween 20) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย blocking solution (Dilute 10x blocking solution 1 : 10 with Maleic acid buffer) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำในลอนเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugate alkaline phosphate ที่เจือจาง 1 : 10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างในลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วปรับสภาพในลอนเมมเบรนด้วยการแช่ในลอนเมมเบรนลงในสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl (pH 9.5 adjusted with NaOH)) นาน 3 นาที โดยไม่ต้องเขย่า ย้ายในลอนเมมเบรนมาวางบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย chemiluminescent substrate (CDP starTM) เข้ากับ detection buffer ในอัตราส่วน 1 : 500 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยลงบนในลอนเมมเบรนให้ทั่ว วางในลอนเมมเบรนไว้ในที่มืด นาน 1 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง นำในลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์มโดยทำในห้องมืด นาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดจึงล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนฟิล์ม

6.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

6.3.1 การเตรียม DNA blot

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสอ่อนที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนตัวอย่างละ 8 ไมโครลิตร มาหยดลงบนไนลอนเมมเบรน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอนเมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยา hybridization ต่อไป

6.3.2 การทำปฏิกิริยา hybridization และการตรวจสอบผลการ hybridization

นำดีเอ็นเอตรวจสอบจากข้อ 6.2.1 มา per-hybridization กับไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 6.3.1 โดยวิธีการเดียวกับข้อ 6.2.3 จากนั้นตรวจสอบผลโดยวิธีการเดียวกับข้อ 6.2.4

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

8. ระยะเวลาทำการทดลอง

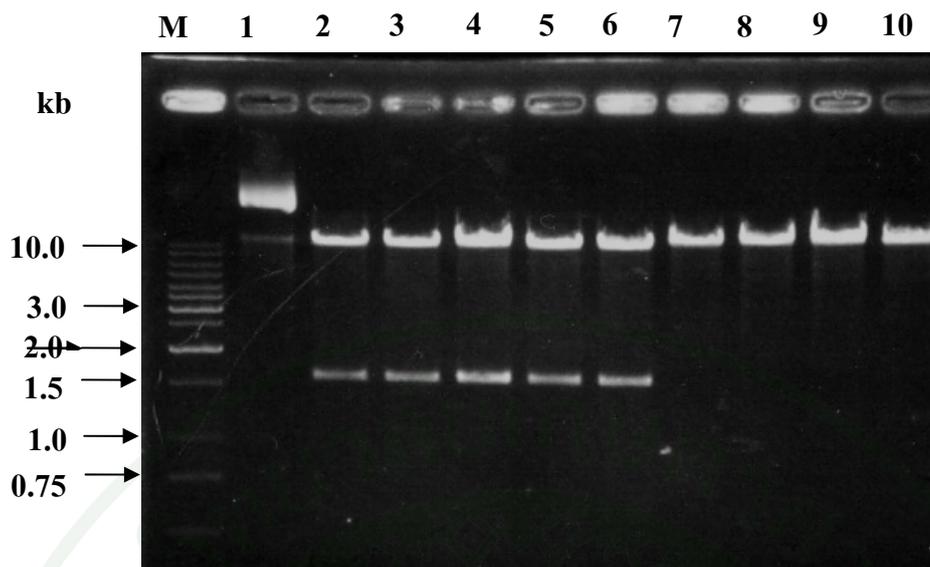
สิงหาคม 2550 – สิงหาคม 2554

ผลและวิจารณ์

1. การนำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *A. tumefaciens*

การบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยใช้วิธี heat shock เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* บนอาหารสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร คัดเลือกโคโลนีเดียวที่สามารถโตได้บนอาหาร คัดเลือกมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ของ *E. coli* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN) ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *XhoI* แล้วแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel พบว่า หลังจากการตัด พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบรูปแบบของการตัด 1 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 12,867 คู่เบส และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* พบรูปแบบของการตัด 2 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 คู่เบสและขนาดประมาณ 11,267 คู่เบส (ภาพที่ 4) โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอของยีน EPSPs จึงสามารถยืนยันได้ว่าพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ได้ถูกถ่ายเข้าไปจริง

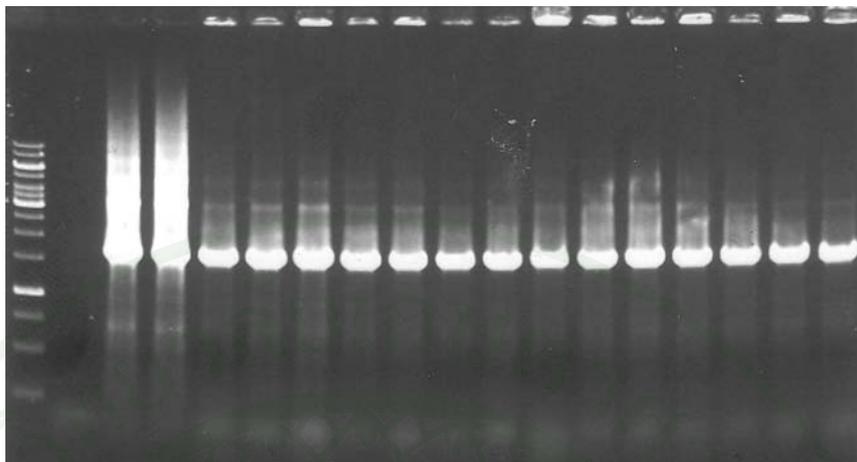
สำหรับการบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่ competent cell ของ *A. tumefaciens* เพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยวิธี electroporation แล้วเพาะเลี้ยงและคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตรวจสอบโดยวิธีพีซีอาร์ เพื่อตรวจหายีน EPSPs พบว่า พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่สกัดได้จากเชื้อ *A. tumefaciens* ที่คัดเลือกไว้ถูกเพิ่มปริมาณให้ขึ้นดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ ของยีน EPSPs ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส (ภาพที่ 5) แสดงว่าในเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ทดสอบมีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 อยู่ สามารถนำไปใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชในขั้นต่อไปได้



ภาพที่ 4 การตรวจวิเคราะห์เวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304 ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* แถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอของยีน *EPSPs*

- M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder DNA marker)
 Lane 1 : ดีเอ็นเอของ pCAM-EPSPs ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
 Lane 2-6 : ดีเอ็นเอของ pCAM-EPSPs ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI*
 Lane 7-10 : ดีเอ็นเอของ pCAM-EPSPs ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



ภาพที่ 5 การตรวจวิเคราะห์ยีน *EPSPs* ที่อยู่ในเวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304 ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *EPSPs*

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder DNA marker)

Lane 1 : น้ำกลั่น (negative control)

Lane 2 3 : พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

Lane 4-17 : ผลผลิตพีซีอาร์ ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *EPSPs* โดยใช้พลาสต์ที่สกัดออกจากเชื้อ *A. tumefaciens* ที่นำพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เข้าสู่เซลล์ แอบดิเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อให้เกิดเป็นต้นอ้อยที่สมบูรณ์

ชักนำแคลลัสจากส่วนใบม้วนชั้นในสุด โดยตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ซึ่งการตัดเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กมีโอกาสนับเป็นแบคทีเรียได้น้อยกว่าเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ แต่ถ้ามีขนาดเล็กเกินไปอาจทำให้โตช้าหรือตายได้ (ปีทมา, 2546) โดยเริ่มจากส่วนปลายยอด (shoot apex) ไปจนถึงส่วนปลายใบรวมยาวประมาณ 5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลพร้าว 10 % เพาะเลี้ยงในที่มืด พบว่า ส่วนของ shoot apex จะเกิดแคลลัสน้อย และมีการปล่อยสารฟีนอลิกออกมา ซึ่งสารนี้เมื่อถูกปล่อยออกมาจะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปลี่ยนสี เนื่องจากเอนไซม์ phenol oxidase หรือ tyrosinase ทำปฏิกิริยากับอากาศหรือสารพวก auxin-cytokinin ทำให้เกิดสีน้ำตาลและขัดขวางการเจริญของเนื้อเยื่อ โดยสามารถกำจัดสารฟีนอลิกออกจากเนื้อเยื่อได้ด้วยการใส่ activated charcoal หรือการใส่สารเคมี PVP จะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยา oxidation หรือลดโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยากับอากาศโดยการใส่สาร antioxidant เช่น L-cystein hydrochloride, glutathione และ mercaptoethanol (อารีย์, 2541) หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตขยายขนาด และเริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณผิวและรอยตัด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4-8 สัปดาห์จะได้แคลลัสที่มีลักษณะผิวหน้าเรียบ เกาะกันแน่น (compact callus) ที่บวมใส เหลืองอ่อน และมีบางส่วนที่อวบน้ำ อ่อนนุ่ม (friable callus) ซึ่งเป็นแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

การใช้สารประกอบ 2,4-D เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น เนื่องจาก 2,4-D เป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่มออกซิน ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินนี้มีผลทำให้เกิดการยืดขยายเซลล์ แต่การชักนำต้นพืชผ่านแคลลัสซึ่งเป็นเนื้อเยื่อพืชที่ประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดยั้ง ต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงทำให้เกิดข้อเสียที่สำคัญ คือ จะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานาน ๆ และการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบถาวร และเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ซึ่งลักษณะนี้อาจเป็นลักษณะทางกายภาพ (physical) และทางสัณฐาน (morphological) ก็ได้ (อารีย์, 2541)

การชักนำให้เนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนของแคลลัสและ somatic embryo มักจะยากต่อการทำให้เกิดต้น โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดต้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ อายุ ชั้นส่วนของพืช สภาวะแวดล้อม และชนิดของอาหาร ซึ่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำต้นนั้น ควรจะมีอัตราส่วนของไซโตไคนินสูงกว่าออกซิน (อารีย์, 2541) การชักนำเซลล์อ้อยให้พัฒนาเป็นต้นทำได้โดยนำแคลลัสชนิด compact มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสาร 2,4-D และ

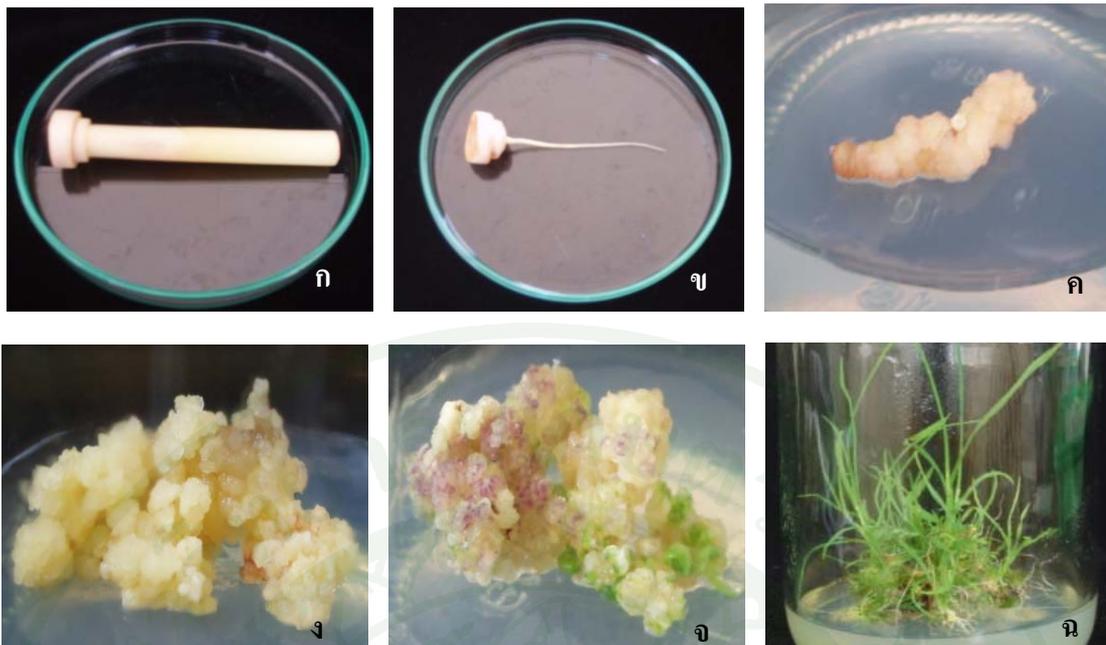
เติมน้ำมะพร้าว 10 % พบว่า แคลลัสสามารถเจริญไปเป็นต้นได้ภายใน 4 สัปดาห์ โดยใน 2 สัปดาห์แรก บางส่วนของแคลลัสจะมีการพัฒนาเป็นจุดสีเขียวซึ่งต่อมาจะเจริญเป็นต้นแต่ยังไม่เกิดราก เมื่อต้นอ้อยมีความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำมาแยกให้เป็นกลุ่มเล็ก ๆ เพราะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ต้นอ้อยจะเกิดรากภายใน 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 6)

3. การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสอ้อยและเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

ภายหลังการถ่ายยีนต้องมีการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียออกจากชิ้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้กัน คือ สารปฏิชีวนะ cefotaxime ซึ่งการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นอาจมีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ดังนั้น จึงต้องเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่สามารถกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียได้หมดและมีผลเชิงลบต่อการเจริญของเนื้อเยื่อน้อยที่สุด

3.1 การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสอ้อย

จากการทดลองเมื่อตัดแคลลัสอ้อยให้เป็นชิ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้แคลลัสจำนวน 15 ชิ้นในแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้น บันทึกผลการเกิดต้น จากการทดลอง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ แคลลัสอ้อยทุกชิ้นสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในทุกระดับความเข้มข้น โดยแคลลัสอ้อยมีการขยายขนาดและปริมาณเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 7) เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้น พบว่า แคลลัสอ้อยสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ตามปกติ (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mittal *et al.* (2009) ที่พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มจำนวนของ somatic embryo ของอ้อย 2 พันธุ์ จากที่ทำการทดสอบทั้งหมด 3 พันธุ์และที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้ยังเพิ่มความสามารถในการเกิดยอด แต่ถ้ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime มากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลให้จำนวนของ somatic embryo และความสามารถในการเกิดยอดลดลง



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13

- ก. ปลายยอดอ้อยอายุ 6-8 เดือน ที่ใช้เพาะเลี้ยง
- ข. ไบวม้วนชั้นในสุดหลังจากลอกกาบไบออกแล้ว
- ค. เนื้อเยื่อส่วนไบวม้วนชั้นในสุด หลังเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ บนอาหารสูตรชักนำแคลลัส
- ง. แคลลัสอ้อยอายุประมาณ 8 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยง
- จ. แคลลัสอ้อยบนอาหารสูตรชักนำต้น หลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์
- ฉ. ต้นอ้อยบนอาหารสูตรชักนำราก หลังเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

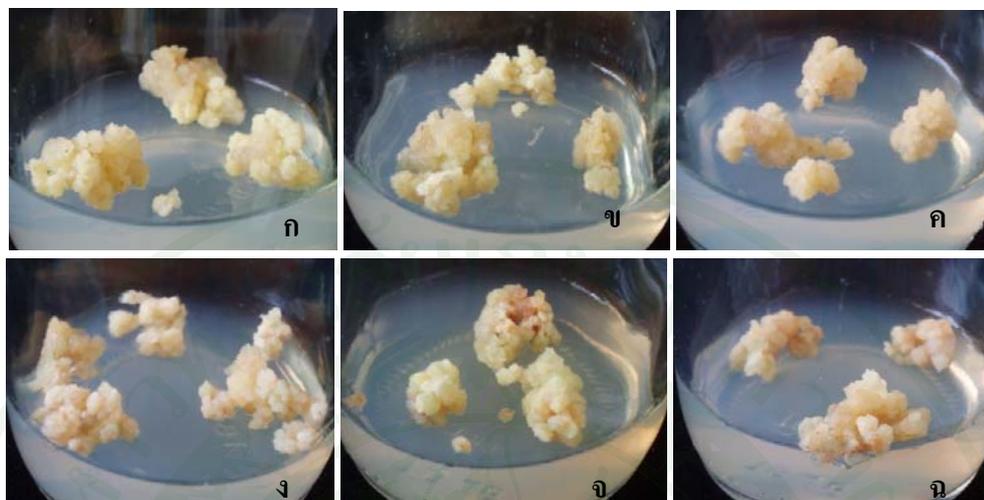
นอกจากนี้งานวิจัยของ Kaur *et al.* (2008) ก็ยืนยันผลการทดลองในทำนองเดียวกัน คือ การเพิ่มสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 250-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแตกหน่อ เพิ่มความยาวของยอดและน้ำหนักสดของอ้อย Danilova and Dolgikh (2004) พบว่า ข้าวโพดพันธุ์ A188 และ F1 hybrid (A188xR91) เกิดต้นมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 150 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ระดับการส่งเสริมของกระบวนการ morphogenesis และความเข้มข้นของสาร cefotaxime ที่มีผลต่อการเกิดยอดขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของข้าวโพด Yu and Wei (2008) พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ส่งเสริมการเกิดยอดในข้าวสาลี Rao *et al.* (1995) พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดในข้าวฟ่างเมล็ดและข้าวฟ่างหวาน เนื่องจากสารปฏิชีวนะ cefotaxime จะทำหน้าที่คล้ายสารกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือช่วยลดการผลิตเอทิลีน

3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

cefotaxime เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะแบคทีเรียจำพวกแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นแท่งโดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้าย alanine residue จึงแย่งจับกับเอนไซม์ transpeptidase แทน alanine residue ของ peptidoglycan สายแรก ทำให้ยับยั้งการเกิด cross link กับ peptidoglycan สายที่ 2 ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ เอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยยาในกลุ่ม penicillins และ cephalosporins นี้อาจเรียกรวมว่า penicillin-binding protein (PBPs) (ปริชาและสุทธิพร, 2549)

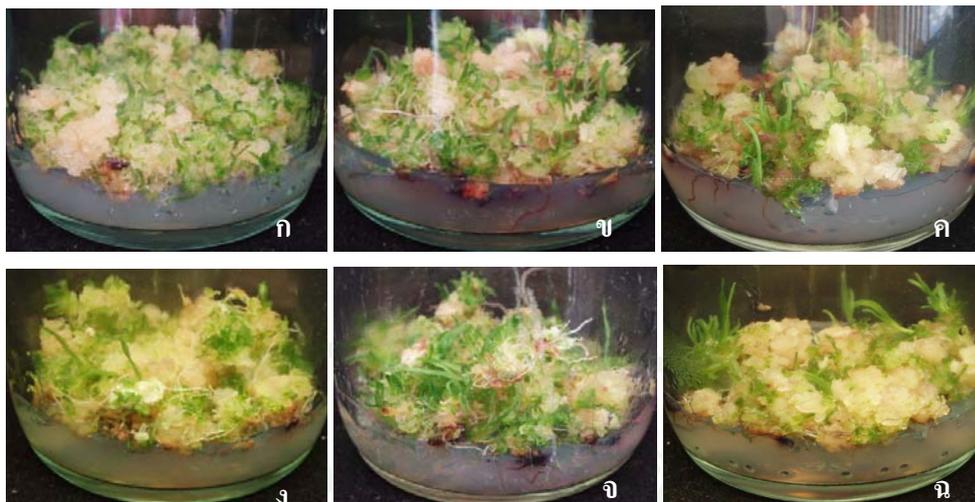
เลี้ยงเชื้ออะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกราแบคทีเรียพบว่า เชื้ออะโกราแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LB เดิม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เริ่มเจริญภายใน 1 วัน หลังการเพาะเลี้ยงและเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารภายในเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้ออะโกราแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ภายหลังการเลี้ยงนาน 4 วัน และเมื่อเลี้ยงต่อจนครบ 1 สัปดาห์ พบเชื้ออะโกราแบคทีเรียเจริญปกคลุมทั่วผิวหน้าของอาหาร ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการ

เจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ (ภาพที่ 9) ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปทำนองเดียวกับการทดลองของ Xing *et al.* (2008)



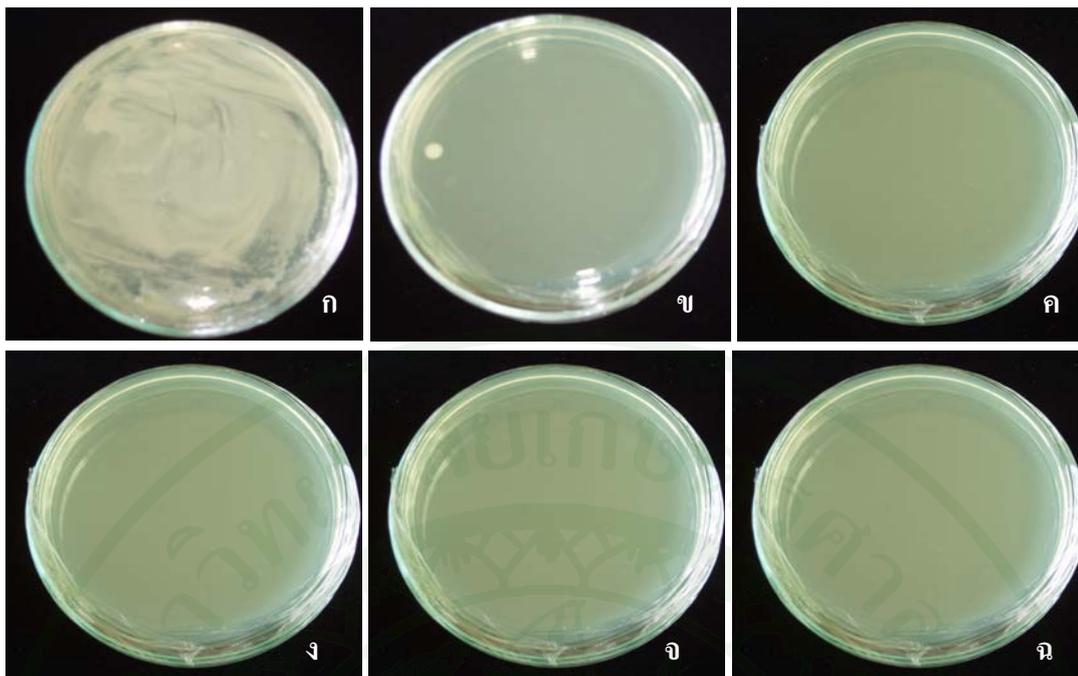
ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของแคลัสต์อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 % ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10 % เพื่อชักนำต้น นาน 9 สัปดาห์ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10 % ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตของเชื้ออะโกราแบคทีเรียม บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังจากการ spread plate นาน 1 สัปดาห์

- ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฉ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สอ้อยโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

ศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์สอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ภายในบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 มียีน *gus* และ *mgfp5* เป็นยีนรายงานผล และยีน EPSPs เป็นยีนคัดเลือก โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) ทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ ตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิธี GUS histochemical assay หลังจากการถ่ายยีน 7 วัน โดยพิจารณาจำนวนชิ้นเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า ในแต่ละทริทเมนต์มีความแตกต่างกัน โดยการใส่เชื้อไม่ต้องเจือจาง ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 88.33 % รองลงมา คือ การไม่เจือจางเชื้อร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 40 นาที และการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 30 นาที ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน 81.67 % และ 80 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เป็นไปในทำนองเดียวกับซึ่งการทดลองของ Cheng *et al.* (1997) พบว่า การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียความเข้มข้นสูง ส่งผลให้การแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวสูงตามไปด้วย

เมื่อพิจารณาระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า ในแต่ละวิธีการที่ทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) โดยการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:1 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 1.55 รองลงมา คือ การไม่เจือจางเชื้อ ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที และการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 30 นาที ให้ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนเซลล์ 1.43 และ 1.08 ตามลำดับ ซึ่งแม้ว่าการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:1 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที จะมีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุดแต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินกลับพบว่ามีค่า 75 % ซึ่งน้อยกว่าวิธีการไม่เจือจางเชื้อร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ที่มีจำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินสูงถึง 88.33 % ซึ่งผลจากการทดลองนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Arencibia *et al.* (1998) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pMTCA31G มีความหนาแน่น 1.0×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับระยะเวลาการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับเซลล์สอ้อยพันธุ์ Ja 60-5 และการทดลองของ Enríquez-Obregón *et al.* (1998) ที่ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ C58C1Rif^R ที่มีพลาสมิด pGV2260 มีค่า OD₆₂₀ ประมาณ 0.6 และปลูกเชื้อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับอ้อยพันธุ์ Ja 60-5 และใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Liu *et al.* (2003) ที่ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 และ AGL1 ที่มีพลาสมิด pCL2, pCL3 และ pCL4 มีค่า OD₆₀₀ = 0.5 ร่วมกับการ

ปลูกเขื่อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับแคลลัสอ้อยพันธุ์ CP-384 และให้ผลใกล้เคียงกับงานวิจัยในพืชชนิดอื่น เช่น Wang *et al.* (2003) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1300 ที่มีค่า $OD_{600} = 0.5$ ร่วมกับการปลูกเขื่อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับใบยาสูบ และงานวิจัยของวิจิตรและคณะ (2549) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ ABI ที่มีพลาสมิด pMON51744 มีค่า $OD_{600} = 1$ ร่วมกับการ sonication นาน 80 วินาที หรือการ vortex นาน 5 และ 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับโซมาติกเอ็มบริโอมะละกอ

ดังนั้นปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อยโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียก็คือ การใช้เชื้อที่มีค่า $OD_{600} \sim 0.8-1$ โดยไม่เจือจางเชื้อ ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเขื่อนาน 10 นาที เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสินน้ำเงินเมื่อตรวจสอบแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* สูงที่สุดถึง 88.33 % และมีระดับคะแนนพื้นที่ติดสินน้ำเงิน 1.43 จากค่าคะแนนเต็ม 9

ตารางที่ 1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay บนแคลลัสอ้อย พันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ซึ่งภายในบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 โดยใช้ ความเข้มข้นของเชื้อและระยะเวลาในการปลูกเชื้อต่าง ๆ

| ความเข้มข้นของสาร แขวนลอยเชื้อ | ระยะเวลาปลูกเชื้อ (นาที) | จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน (เปอร์เซ็นต์) | ระดับคะแนนพื้นที่ ที่ติดสีน้ำเงิน |
|-----------------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| 1:0 | 10 | 88.33 | 1.43 ^{ab1/} |
| | 20 | 70.00 | 0.85 ^{a-f} |
| | 30 | 66.67 | 0.96 ^{a-c} |
| | 40 | 81.67 | 1.03 ^{a-d} |
| 1:1 | 10 | 75.00 | 1.55 ^a |
| | 20 | 66.67 | 0.78 ^{a-f} |
| | 30 | 66.67 | 0.91 ^{a-c} |
| | 40 | 31.67 | 0.38 ^{efg} |
| 1:10 | 10 | 55.00 | 0.75 ^{b-g} |
| | 20 | 55.00 | 0.56 ^{c-g} |
| | 30 | 80.00 | 1.08 ^{abc} |
| | 40 | 43.33 | 0.48 ^{c-g} |
| 1:20 | 10 | 41.67 | 0.56 ^{c-g} |
| | 20 | 46.67 | 0.91 ^{a-g} |
| | 30 | 51.67 | 0.51 ^{c-g} |
| | 40 | 35.00 | 0.40 ^{efg} |
| 1:50 | 10 | 38.33 | 0.53 ^{c-g} |
| | 20 | 38.33 | 0.46 ^{d-g} |
| | 30 | 55.00 | 0.71 ^{c-g} |
| | 40 | 36.67 | 0.46 ^{efg} |
| 1:100 | 10 | 55.00 | 1.00 ^{a-c} |
| | 20 | 28.33 | 0.28 ^{fg} |
| | 30 | 40.00 | 0.40 ^{efg} |
| | 40 | 21.67 | 0.217 ^g |

^{1/}ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ LSD ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95%

5. การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่แคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

จากการถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่แคลลัสอ้อยโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม ซึ่งมีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็นพาหะ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกซึ่งประกอบด้วยอาหารแข็งสูตรชักนำต้น ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารไกลโฟเสท 0.5 mM เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน ได้แคลลัสที่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 10 โคลน ส่วนแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตาย (ภาพที่ 10)

เมื่อนำแคลลัสอ้อยที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกมาชักนำให้เกิดขึ้นบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้น นาน 1 เดือน พบว่า แคลลัสมีสีเหลืองอ่อนตามปกติ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุด้วยกัน ได้แก่ อายุของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ Wang *et al.* (2005) ตั้งข้อสังเกตว่า การ sub-culture เป็นเวลานาน ส่งผลให้ความสามารถในการชักนำให้เกิดขึ้นภายหลังการถ่ายยีนลดลง หรือระบบการชักนำให้เกิดขึ้นภายหลังการถ่ายยีนไม่เหมาะสม สุมนา (2550) ไม่สามารถชักนำให้เกิดขึ้นจากแคลลัสหุ่ยารูซึ่งได้เลย หลังจากถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยแนะนำว่าต้องมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพภายหลังการถ่ายยีน เช่น การพัฒนาองค์ประกอบของสูตรอาหารชักนำต้นภายหลังการถ่ายยีน หรือการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนและสามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ดีกว่าการใช้แคลลัสเป็นต้น

Xu *et al.* (2008) รายงานว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถช่วยแก้ไขปัญหาการไม่เกิดขึ้นของแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนได้

Rafat *et al.* (2010) พบว่า ปัญหาหลักของการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม คือ การเกิดเป็นต้นของชิ้นพืชหลังการ co-cultivation โดยการเกิดเป็นต้นหลังการ co-cultivation มีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างจากชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ผ่านการ co-cultivation ด้วยอะโกรแบคทีเรียม จากการทดลองหลังการถ่ายยีนเข้าสู่กะหล่ำปลี พันธุ์ KY Cross ด้วยอะโกรแบคทีเรียม 2 สายพันธุ์ (C58 และ GV2260) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นพืช (hypocotyls และ shoot tip) บนอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดต่อชิ้น และ เปอร์เซ็นต์ยอดที่ผ่านการถ่ายยีน สูงที่สุด เมื่อถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมทั้ง 2 สายพันธุ์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงชิ้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จะใช้ BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยระบบการชักนำให้เกิดขึ้นภายหลังการ co-cultivation ที่เหมาะสมจะเพิ่มประสิทธิภาพ

การเกิดต้นใหม่ของเซลล์ที่ผ่านการถ่ายยีน ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนอาจจะสำคัญในพืชบาง species เพื่อการเกิดต้นหลัง co-cultivation ด้วยอะโกรแบคทีเรีย

Li-Li *et al.* (2011) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวสาลีโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย พบว่าปัญหาที่สำคัญที่สุด คือ ประสิทธิภาพการเกิดต้นในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวสาลีภายหลังการถ่ายยีนมีค่าต่ำจากการทดลอง พบว่า immature embryos ของข้าวสาลีทั้ง 20 พันธุ์ จาก 29 พันธุ์ ภายหลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย มีความสามารถในการเกิดต้น 0.1-24.9 % จากนั้นศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D และ dicamba ต่อการชักนำแคลลัสและการเกิดเป็นต้นหลังการถ่ายยีน พบว่า พันธุ์ที่ต่างกันจะมีการตอบสนองต่อสารกลุ่มออกซินต่างกัน โดยเมื่อใช้ dicamba แทน 2,4-D จะเพิ่มความสามารถในการชักนำแคลลัสและความถี่ของการเกิดต้นภายหลังการถ่ายยีน หรือขึ้นอยู่กับ genotype และแหล่งที่มาของชิ้นพืช (Li-Li *et al.*, 2011) และผลของสารปฏิชีวนะ โดย Rafat *et al.* (2010) พบว่า การบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและสารปฏิชีวนะ hygromycin B อาจจะมีผลต่อความสามารถในการเกิดต้น หรือสารไกลโอฟเสทที่ใช้ในอาหารคัดเลือก เช่น Tong *et al.* (2010) รายงานว่าปัญหาที่พบบ่อย คือ เมื่อมีการใช้สารไกลโอฟเสทในอัตราสูงระหว่างการชักนำให้เกิดต้น จะส่งผลให้มีอัตราการเกิดต้นต่ำ และเป็นการยากที่จะชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านกระบวนการ somatic embryogenesis เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารไกลโอฟเสทเข้มข้น 1 mM หรือสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำต้นภายหลังการถ่ายยีนไม่เหมาะสม หรือความสามารถในการทำงานของโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน

ซึ่งสอดคล้องกับหลายการทดลองที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ภายหลังการถ่ายยีนหรือมีความสามารถในการเกิดต้นต่ำ เช่น Zhou *et al.* (1995) รายงานว่า เมื่อนำแคลลัสข้าวสาลีที่ผ่านการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโอฟเสท ความเข้มข้น 0.1 mM มีเพียง 0.15 % ของแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกจะสามารถผลิตข้าวสาลีที่ต้านทานต่อสารไกลโอฟเสทได้

Zhao *et al.* (2006) ถ่ายยีนเข้าสู่ฝ้ายพันธุ์ Zhongmian 35 โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ LBA4404 พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก hypocotyl ที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 40 ยอด จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีน 1,790 ชิ้น หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสารไกลโอฟเสท ความเข้มข้น 500 μ M

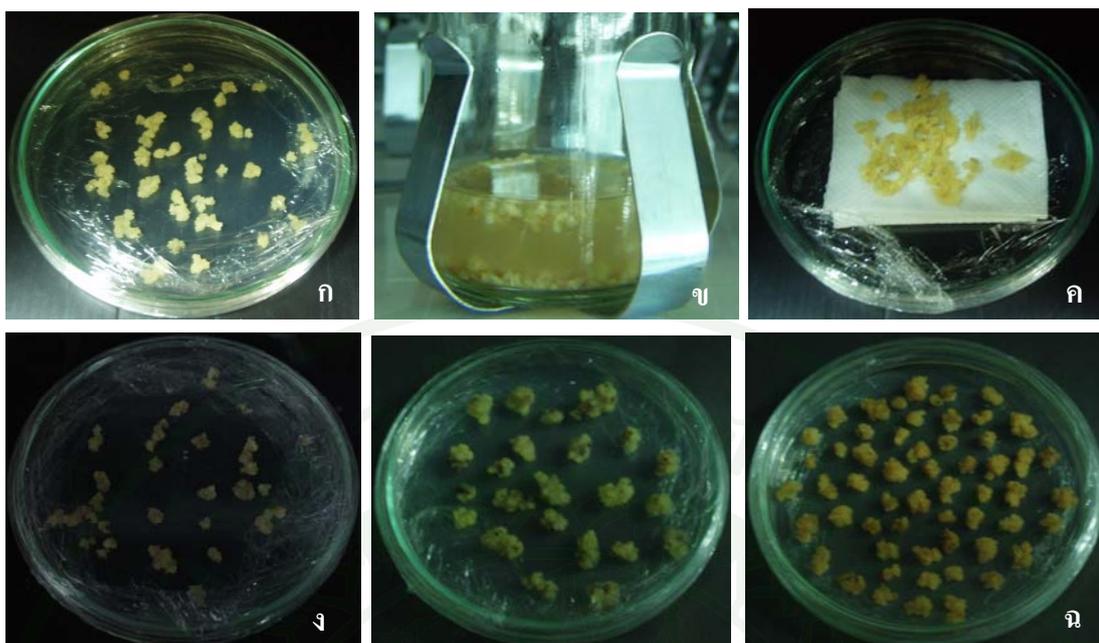
Tyagi *et al.* (2007) รายงานว่า การใช้สาร 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสและการเกิดเป็นต้นของข้าวพันธุ์ ADT39 และ การใช้ความเข้มข้นของสาร augmentin ที่ความเข้มข้นสูง เหมาะสมที่สุดสำหรับการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีน เท่ากับ 22.2 % และความเข้มข้นของสารที่ใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เช่น cefotaxime, carbenicillin, augmentin เป็นต้น ในระดับสูง ๆ อาจลดความสามารถในการเกิดต้นของแคลลัส เนื่องจากสารปฏิชีวนะเหล่านี้ มีโครงสร้าง คล้ายกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและเมื่อใช้ร่วมกับสาร 2,4-D อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการเกิดเป็นต้นลดลง จากการทดลองของพวกเขา พบว่า การลดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียลงสามารถเพิ่มความสามารถในการเกิดเป็นต้นของแคลลัสหลังการถ่ายยีนได้

Roudsari *et al.* (2009) รายงานว่า หลังการทดลองถ่ายยีนหลายครั้งโดยใช้พลาสมิด pKCZ ภายในบรรจุยีน EPSPs ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเข้าสู่พลาสต์ของยาสูบ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารไกลโฟเสทบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารไกลโฟเสทในทุก ๆ ความเข้มข้นที่ทดสอบ เนื่องจากสารไกลโฟเสททำให้พลาสต์เกิดความเสียหาย (ร่างแหของไทลาคอยด์และเยื่อหุ้มเซลล์จะแตกสลาย) ดังนั้นพวกเขาก็แนะนำว่า ควรวางเพาะเลี้ยงพลาสต์ 2 สัปดาห์ ก่อนที่จะเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกและพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้สมบูรณ์เพื่อสามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ได้

Joyce *et al.* (2010) รายงานว่า ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสอ้อยเกิดเป็นต้นได้หลังจากการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ LBA4404-pCAMBIA1305.1 และ AGL1-pWB-Vec10a ซึ่งการที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้นั้นอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากพันธุ์อ้อยที่ใช้ หรือ CaMV35S promoter ที่ทำให้มีการแสดงออกของยีน *hph* น้อย แต่ Arencibia *et al.* (1998) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยโดยใช้ยีน *hph* ที่มี CaMV35S promoter พวกเขาจึงทดลองเปลี่ยนมาใช้พลาสมิด pPjub2 ที่มียีน *nptII* ภายใต้การควบคุมของ *ubi-l* promoter พบว่า แคลลัสอ้อยที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin และมีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อนำมาชักนำต้น พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นต่ำอยู่ในช่วง 0.8-4.8 %

Basnayake *et al.* (2011) รายงานว่า แคลสัสอ้อยพันธุ์ KQ228 ที่ผ่านการถ่ายยีนมีความสามารถในการเกิดต้นเพียง 30 % บนอาหาร MSC₀ ที่เติมสารปฏิชีวนะ geneticin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและพบว่า การเกิดต้นจะเพิ่มขึ้น 72-82 % เมื่อลดความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ geneticin ลงเหลือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร





ภาพที่ 10 ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยใช้
เวกเตอร์ pCAM-EPSPs 1304

- ก. ลักษณะของแคลลัสที่ใช้สำหรับถ่ายยีน
- ข. ขั้นตอนการ inoculation ในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อยด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม
- ค. ย้ายแคลลัสวางซับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออกบนกระดาษซับที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- ง. ย้ายแคลลัสวางบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์
- จ. ลักษณะแคลลัสอ้อย ภายหลังจากถ่ายยีนหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 1 เดือน
- ฉ. ลักษณะแคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 1 เดือน

6. การตรวจวิเคราะห์อ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน

6.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

สกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสอ้อยที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกและแคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *EPSPs* จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของยีน *EPSPs* ขนาด ประมาณ 1,600 คู่เบส (ภาพที่ 11) ซึ่งจากการตรวจสอบแคลลัสอ้อยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน จำนวน 10 โคลน พบโคลนที่มียีน *EPSPs* จำนวน 5 โคลน

สำหรับโคลนที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วไม่พบยีน *EPSPs* จำนวน 5 โคลน คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกนั้น อาจเกิดจากระหว่างการคัดเลือกแคลลัสบางส่วนที่อยู่ด้านบนไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกมีการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งระบบการถ่ายยีนส่วนใหญ่มักพบปัญหาการ escape ของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในหลาย ๆ การทดลอง เช่น Wang *et al.* (2005) ได้ถ่ายยีน *TSase* เข้าสู่อ้อยโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งมียีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก เมื่อตรวจสอบพืชที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า 70 % ของต้นที่ได้มาจากแคลลัสที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เช่นเดียวกับ Wang *et al.* (2009) ที่รายงานว่า มีอ้อยที่ผ่านการถ่ายยีนจำนวน 2 จาก 19 ต้น ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *nptII* และ Kalunke *et al.* (2009) ได้ถ่ายยีน *CryIaA3* เข้าสู่อ้อยโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 และมียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือก ตรวจสอบพืชที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า มีพืชที่ผ่านการถ่ายยีน 12 จาก 44 ต้น ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *CryIaA3* พวกเขา รายงานว่า การที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในต้นพืชที่ผ่านการถ่ายยีนบางต้นนั้น อาจเนื่องมาจาก ความเข้มข้นของสารคัดเลือกที่ใช้ต่ำเกินไป

ส่วน Jing-Sheng *et al.* (2008) ตรวจสอบต้นอ้อยที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเทคนิค nested PCR พบว่า ต้นอ้อย 9 ต้น จากทั้งหมด 207 ต้น ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *CryIA(c)* ที่มีต้นที่เกิดการ escape มากเนื่องจากการคัดเลือกแคลลัสหลังการถ่ายยีนล่าช้า จึงทำให้แคลลัสตั้งตัวได้ก่อนที่จะเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก

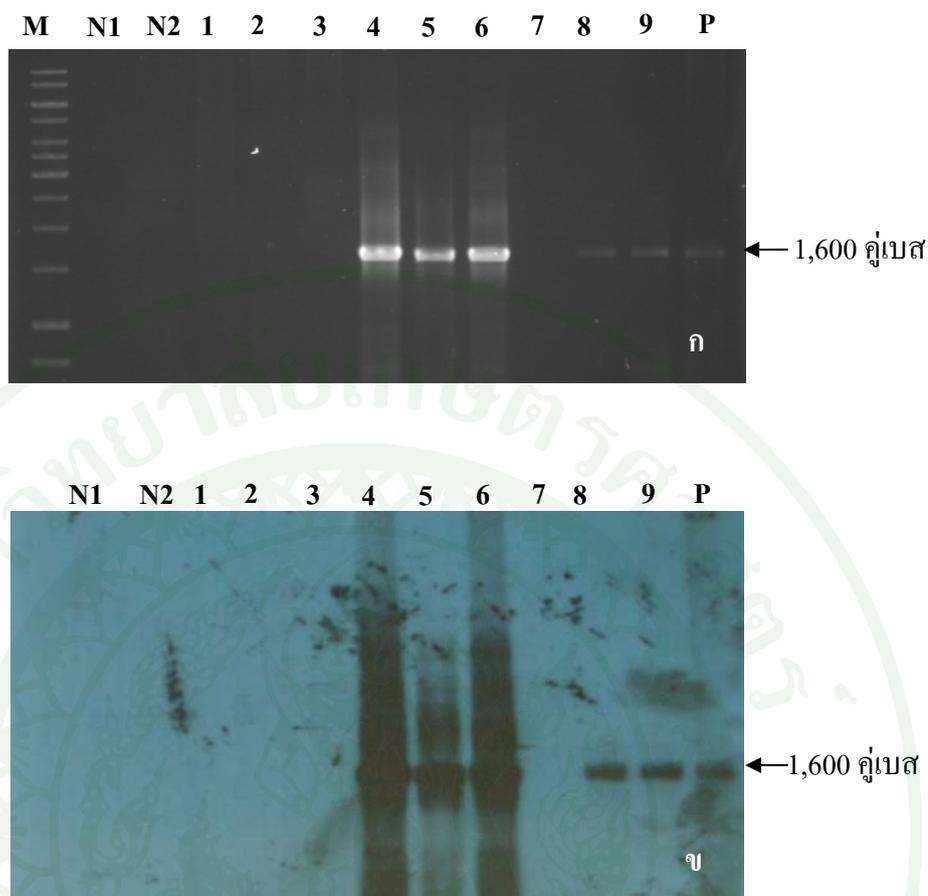
6.2 การยืนยันการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในแคลลัสอ้อยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ในจีโนมของอ้อย โดยตรวจสอบกับแคลลัสอ้อย ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โคลนที่ 1-9 ซึ่งจากผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอของยีน *EPSPs* ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส ในโคลนที่ 4 5 6 8 และ 9 (ภาพที่ 11ก) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization โดยการไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *EPSPs* ที่ติดฉลากด้วยสารไวรั้งสี digoxigenin (DIG) จากนั้นตรวจสอบผลโดยนำเมมเบรนไปทาบกับแผ่นฟิล์ม X-ray นาน 60 นาที ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะปรากฏแถบสีดำบนแผ่นฟิล์ม จากผลการทดลอง พบว่า เกิดแถบสีดำบนแผ่นฟิล์ม ตรงกับแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส ของยีน *EPSPs* (ภาพที่ 11ข) ซึ่งให้ผลเหมือนกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ใช้คือ พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (positive control) และไม่พบแถบสีดำในแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและน้ำกลั่น (negative control) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเป็นยีน *EPSPs* จริงและอาจสามารถสอดแทรกเข้าไปรวมกับจีโนมของอ้อยได้

6.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

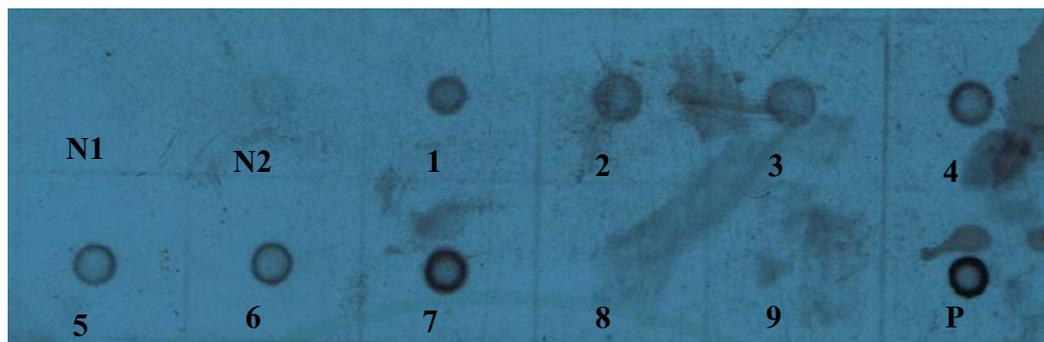
นำจีโนมดีเอ็นเอของแคลลัสที่มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยการหยดดีเอ็นเอลงบนไนลอนเมมเบรน ตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *EPSPs* ที่ติดฉลากด้วยสารไวรั้งสี digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำไนลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ซึ่งการตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจากอ้อยที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 เป็น positive control

จากการทดลอง ได้สกัดดีเอ็นเอจากแคลัสต์อ้อยที่คาดว่าได้รับยีน แล้วนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* โดยทำการ hybridization กับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *EPSPs* ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอตรวจสอบจะให้ผลเป็นสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม จากการทดลอง พบว่า ปรากฏจุดสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *EPSPs* ในโคลนที่ 1 2 3 4 5 6 และ 7 (ภาพที่ 12) ซึ่งโคลนที่ 4 5 และ 6 ให้ผลสอดคล้องกับผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และผลของ Southern PCR hybridization แสดงว่ายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปไปรวมตัวกับจีโนมของอ้อยได้อย่างถาวร ส่วน N2 ซึ่งเป็นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนปรากฏจุดสัญญาณอาจมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการล้างเมมเบรนด้วย สารละลาย low stringency buffer และ high stringency buffer มีความเข้มข้นของสาร SSC น้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถล้างโพรบที่ไม่จำเพาะเจาะจงออกได้หมด ส่วนในโคลนที่ 1 2 และ 3 ไม่ปรากฏแถบสีดำนบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization แต่ปรากฏจุดสัญญาณสีดำเมื่อทำ dot blot hybridization อาจมีสาเหตุมาจาก อุณหภูมิที่ใช้สำหรับขั้นตอน hybridization สูงไม่เพียงพอทำให้ความจำเพาะเจาะจงของโพรบลดลง และในโคลนที่ 8 และ 9 ปรากฏแถบสีดำนบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization แต่ไม่ปรากฏจุดสัญญาณสีดำเมื่อทำ dot blot hybridization อาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ อาจมีความเข้มข้นไม่เพียงพอ เนื่องจากไม่ได้วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอก่อนที่นำมาทำ dot blot hybridization ทำให้ในแต่ละตัวอย่างที่นำมา dot blot มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่เท่ากัน



ภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* จากแคลลัสอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ก) และ Southern/PCR blot (ข) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *EPSPs* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส โดยทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *EPSPs*

- M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder DNA marker)
 N1 : น้ำกลั่น (negative control)
 N2 : ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสอ้อยที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)
 1-9 : ดีเอ็นเอจากแคลลัสอ้อยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน
 P : พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (positive control)



ภาพที่ 12 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *EPSPs* อย่างถาวรด้วยเทคนิค dot blot hybridization ในแคลลัสที่คาดว่ายีนได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

- N1 : น้ำกลั่น (negative control)
 N2 : ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสย่อยที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)
 1-9 : ดีเอ็นเอจากแคลลัสย่อยที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน
 P : พลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 (positive control)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต้านลบต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นอ่อน ดังนั้นจึงสามารถใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยได้
2. การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ
3. สำหรับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่า การใช้เชื้อที่มีค่า $OD_{600} \sim 0.8-1$ โดยไม่เจือจางเชื้อร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินเมื่อตรวจสอบการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* สูงที่สุดถึง 88.33% และมีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน 1.43 จากค่าคะแนนเต็ม 9
4. การถ่ายยีน *EPSPs* เข้าสู่แคลลัสอ้อยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 พบว่า มีแคลลัสที่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 10 โคลน และเมื่อคัดเลือกแคลลัสที่ได้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบ โคลนที่มียีน *EPSPs* จำนวน 5 โคลน เมื่อนำโคลนที่ได้ทั้งหมดมายืนยันผลโดยวิธี Southern PCR hybridization และ dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับยีน *EPSPs* พบว่า มียีน *EPSPs* อยู่จริงและสอดแทรกเข้าไปในจีโนมของอ้อยได้

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าการศึกษาในครั้งนี้จะไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสอ้อยตัดแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากสำหรับการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรม แต่การทดลองครั้งนี้ก็ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยซึ่งสามารถใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการถ่ายยีน โดยจะต้องมีการศึกษาและพัฒนากระบวนการคัดเลือก หรือระบบการชักนำให้เกิดต้นภายหลังการถ่ายยีนแก่แคลลัสอ้อยให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรีก นฤทุม, เกษม สุขสถาน, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, อิศรา สุขสถาน, รงรอง วิเศษสุวรรณ, ศิริวรรณ บุรีคำ, สุภาพร กลิ่นคง และมณฑา สุริยะไชยากร. 2534. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปลายยอดอ้อยให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์. รายงานผลการวิจัย สถาบันวิจัยแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 11 น.

กรมวิชาการเกษตร. 2008. ฐานความรู้ด้านพืชพลังงานทดแทน. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/power_oil/WebSugarcaneNew/index.html, 5 กันยายน 2554.

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

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2553. การส่งออกน้ำตาลไปนอกราชอาณาจักร จำแนกตามประเทศปลายทาง ยอดสะสมเดือนมกราคม-ธันวาคม 2553. แหล่งที่มา: <http://www.ocsb.go.th/upload/cuntry/fileupload/183-2025.pdf>, 5 กันยายน 2554.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2553. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2552/53. แหล่งที่มา: <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-3376.pdf>, 5 กันยายน 2554.

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

ประเสริฐ นัตรจิวรัมย์. 2547. อ้อย, น. 272-295. ใน นพพร สายัมพล เรวัตติ เลิศฤทัยโยธิน รังสฤษดิ์ กาวิตะ และสนธิชัย จันท์เปรม, บรรณาธิการ. พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปรีชา มณฑกานติกุล และ สุทธิพร ภัทรชยากุล. 2549. ยาต้านจุลชีพกลุ่มเซฟาโลสปอริน

(Therapeutic review of cephalosporins). แหล่งที่มา:

http://www.thaihp.org/index.php?option=other_detail&lang=th&id=15&sub=26,

20 กรกฎาคม 2554.

ปัทมา ศรีน้ำเงิน. 2546. การถ่ายยีนบางส่วนของ antisense invertase เข้าสู่อ้อย. วิทยานิพนธ์

ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ. 2542. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช, 22-34. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องพันธุ์

วิศวกรรมด้านพืช. หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ
เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา, บุญเลิศ โพธิ์เจริญ และอุทัย จารณศรี. 2524. การเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยในสภาพ

ปลอดเชื้อ: I. อิทธิพลของสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ.

รายงานผลการวิจัย สถาบันวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 8 น.

ภัทรพร ศุภปัญญาพงศ์. 2549. การถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการจำลองตัวของ

ไวรัสใบหงิกเหลืองเข้าสู่มะเขือเทศโดยใช้ *ipt-type* MAT vector. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รังสิต สุวรรณเขตนิกม. 2547. สารป้องกันกำจัดวัชพืช: พื้นฐานและวิธีการใช้.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 467 น.

รณยุทธ์ สัตยานิกม. ม.ป.ป. อ้อยพันธุ์ส่งเสริม. แหล่งที่มา:

http://www.ocsb.go.th/udon/Udon8/490622_4.htm, 23 สิงหาคม 2550.

วิจิตรา โทราเรือง, กนกวรรณ รมยานนท์, มณฑนา บุญธรรม, Stanislaw Flasiński และ

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2549. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียของ

เนื้อเยื่อโซมาติกเอ็มบริโอมะละกอ ว.วิจัย.กษ. 37(3):231-239.

สุมนา เหลืองจิตติกาญจนา. 2550. การถ่ายยีน *VPI* ของโรคไวรัสปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่หน่อข้าวไร่โดยใช้
ใช้อะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป.. การถ่ายทอดยีน. แหล่งที่มา
http://guru.sanook.com/enc_preview.php?id=2196, 18 มกราคม 2554.

อารีย์ วรรณวุฒิก. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 1.
โรงพิมพ์อติสรณ์, กรุงเทพฯ.

อุดม พูลเกษ. 2541. อ้อย, น.131-141. ใน พฤษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

Basnayake, S.W.V., R. Moyle and R.G. Birch. 2011. Embryogenic callus proliferation and
regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars.
Plant Cell Rep. 30: 439-448.

Bower, R., A.R. Elliott, B.A.M. Potier and R.G. Birch. 1996. High-efficiency, microprojectile-
mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers.
Mol.Breed. 2: 239-249.

Bower, R. and R.G. Birch. 1992. Transgenic sugarcane plants *via* microprojectile bombardment.
Plant J. 2: 409-416.

- Cheng, M., J.E. Fry, S. Pang, I. Zhou, C. Hironaka, D.R.I. Duncan, T.W.L. Conner and Y. Wang. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant. Physiol.** 115: 971-980.
- Chowdhury, M.K.U. and I.K. Vasil. 1992. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane *via* microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Rep.** 11: 494-498.
- Cuellar, J.M. 1997. *In vitro* test for the vegetative propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from young leaves. **Agrono. Mesoamericana.** 8: 74-80.
- Danilova, S.A. and Yu. I. Dolgikh. 2004. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. **Russian J. of Plant Physiology.** 51:559-562.
- Doyle, J.J. and J.J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 12: 13-15.
- Enríquez-Obregón, G.A., R.I. Vázquez-Padrón, D.L. Prieto-Samsonov, G.A. De la Riva and G. Selman-Housein. 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta.** 206: 20-27.
- Falco, M.C., A.T. Neto and E.C. Ulian. 2000. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Rep.** 19: 1188-1194.
- Gill, R., P.K. Malhotra and S.S. Gosal. 2006. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tiss. and Organ Cult.** 84: 227-231.
- Heinz, J.D. and G.W.D. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Sci.** 9: 346-348.

- Hossain, M.R., L. Hassan, A.K. Patwary and M.J. Ferdous. 2009. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation protocol for aromatic rice. **J. Bangladesh Agril. Univ.** 7: 235–240.
- Howe, A.R., C.S. Gasser, S.M. Brown, S.R. Padgett, J. Hart, G.B. Parker, M.E. Fromm and C.L. Armstrong. 2002. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. **Mol.Breed.** 10: 153-164.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene system. **Plant Mol. Biol. Rep.** 5: 387-405.
- Jing-Sheng, X., G. Shiwu, X. Liping and C. Rukai. 2008. Construction of expression vector of *CryIA(c)* gene and its transformation in sugarcane. **Sugar Tech.** 10: 269-273.
- Joyce, P., M. Kuwahata, N. Turner and P. Lakshmanan. 2010. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Rep.** 29:173–183.
- Kalunke, R.M., A.M. Kolge, K.H. Babu and D.T. Prasad. 2009. *Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane for borer resistance using *Cry IAa3* gene and one-step regeneration of transgenic plants. **Sugar Tech.** 11: 355-359.
- Kaur, A., M.S. Gill, D. Ruma and S.S. Gosal. 2008. Enhanced *in vitro* shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime. **Sugar Tech.** 10: 60-64.
- Khalil, S.M.. 2001. Regeneration *via* somatic embryogenesis and microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane. **Arab J. Biotech.** 5: 19-32.

- Kharinarain, R.P., Y.I. Dolgikh and Y.L. Guzhov. 1996. Selection of media for mass regeneration of sugarcane plants from callus culture. **Rus. J. Plant Physiol.** 43: 97-100.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. **Plant Cell Tiss. and Organ Cult.** 2: 111-122.
- Li-Li, T., Y. Gui-Xiang, D. Li-Pu, S. Zheng-Yuan, S. Mao-Yun, X. Hui-Jun and Y. Xing-Guo. 2011. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens*. **Agri. Sci. China.** 10: 317-326.
- Liu, D., S.V. Oard and J.H. Oard. 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. **Plant Sci.** 165: 743-750.
- Lowe B.A., N.S. Prakash, M. Way, M.T. Mann, T.M. Spencer and R.S. Boddupalli. 2009. Enhanced single copy integration events in corn *via* particle bombardment using low quantities of DNA. **Transgenic Res.** 18: 831-840.
- Manickavasagam, M., A. Ganapathi, V.R. Anbazhagan, B. Sudhakar, N. Selvaraj, A. Vasudevan and S. Kasthuriengan. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Rep.** 23: 134-143.
- Mittal, P., S.S. Gosal, A. Senger and P. Kumar. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. **Physiol. Mol. Biol. Plants.** 15: 257-265.
- Mulwa, R.M.S. and L.M. Mwanza. 2006. Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. **African J of Biotech.** 5: 396-404.

- Nickell, L.G. 1964. Tissue and cell culture of sugarcane another research tool. **Hawaii Planters Rec.** 57: 223-229.
- _____. 1977. Crop improvement in sugarcane studies using *in vitro* method. **Crop Sci.** 17: 717-719.
- Rafat, A., M.A. Aziz, S.N.A. Abdullah, H.Kamaladini, M.H.T. Sirchi and M.B. Javad. 2010. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and shoot regeneration after co-cultivation of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. *capitata*) cv. KY Cross with *AtHSP101* gene. **Sci. Hort.** 124: 1-8.
- Rao, A.M., K.P. Sree and P.B. Kavi Kishor. 1995. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. **Plant Cell Rep.** 15: 72-75.
- Roudsari, M.F., A.H. Salmanian, A. Mousavi, H.H. Sohi and M. Jafari. 2009. Regeneration of glyphosate-tolerant *Nicotiana tabacum* after plastid transformation with a mutated variant of bacterial *aroA* gene. **Iranian J. Biotech.** 7: 247-253.
- Samiphak, K. and N. Siwarungson. 2006. Transformation and expression of green fluorescent protein and barley stress-induced embryogenic *hva 1* gene in *Indica* rice KDML 105 by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 31: 33-48.
- Seema, G., H.P. Pande, J. Lal and V.K. Madan. 2001. Plantlet regeneration of sugarcane varieties and transient GUS expression in calli by electroporation. **Sugar Tech.** 3: 27-33.
- Sundar, I.K. and N. Sakthivel. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. **J Plant Physiol.** 165: 1698-1716.

- Tiel, K., G.A. Enríquez, Y. Ceballo, N. Soto, A.D. Fuentes, A. Ferreira, Y. Coll and M. Pujol. 2006. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotecnología Aplicada**. 23: 22-24.
- Tong, X.H., M.K. Daud and S.J. Zhu. 2010. Selection and characterization of a novel glyphosate-tolerant upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutant (R1098). **Plant Breed**. 129: 192-196.
- Tyagi, H., S. Rajasubramaniam and I. Dasgupta. 2007. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of a popular indica rice variety ADT39. **Curr. Sci**. 93: 678-683.
- Xing, Y.J., Q. Ji, Q. Yang, Y.M. Luo, Q. Li and X. Wang. 2008. Studies on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato. **African J. Biotech**. 7: 534-540.
- Xu, L.M., Y.X. Que, J.S. Xu, S.R. Fang, M.Q. Zhang, Y.Q. Chen and R.K. Chen. 2008. Establishment of genetic transformation system and obtaining transgenic sugarcane (var. badila) transformed with RS gene. **Sugar Tech**. 10: 128-132.
- Yu, Y. and Z.-M. Wei. 2008. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biologia Plant**. 52: 553-556.
- Verma, A., V. Nain, C. Kumari, S.K. Singh, M.L. Narasu and P.A. Kumar. 2008. Tissue specific response of *Agrobacterium tumefaciens* attachment to *Sorghum bicolor* (L) Moench. **Physiol. Mol. Biol. Plants**. 14: 307-313.
- Wang, A.-Q., W.-Q. Dong, Y.-W. Wei, C.-M. Huang, L.-F. He, L.-T. Yang and Y.-R. Li. 2009. Transformation of sugarcane with ACC oxidase antisense gene. **Sugar Tech**. 11: 39-43.

- Wang, H.-Y., Y.-F. Li, L.-X. Xie and P. Xu. 2003. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA-M1*, encoding 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. **J. Plant Res.** 116: 455-460.
- Wang, Z.-Z., S.-Z. Zhang, B.-P. Yang and Y.-R. Li. 2005. Trehalose synthase gene transfer mediated by *Agrobacterium tumefaciens* enhances resistance to osmotic stress in sugarcane. **Sugar tech.** 7: 49-54.
- 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.
- Zambrano, A.Y., J.R. Demey and V. González. 2003. *In vitro* selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. **Plant Mol. Biol. Reporter.** 21: 365-373.
- Zhao, F.-Y., Y.-F. Li and P. Xu. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. *Zhongmian 35*) using glyphosate as a selectable marker. **Biotechnol Lett.** 28: 1199-1207.
- Zhou, H., J.W. Arrowsmith, M.E. Fromm, C.M. Hironaka, M.L. Taylor, D. Rodriguez, M.E. Pajean, S.M. Brown, C.G. Santino, and J.E. Fry. 1995. Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. **Plant Cell Rep.** 15: 159-163.



การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* สำหรับการทำให้ electroporation

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2X-YT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหาร 2X-YT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.25-0.3 ปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน 10 % sterile glycerol ที่แช่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน 10 % sterile glycerol ที่แช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด หลอดละ 120 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์แข็งอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลว เก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

| | |
|----------------------|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวกุสุมา รอดแผ้วพาล |
| วัน เดือน ปี เกิด | 30 สิงหาคม พ.ศ.2525 |
| สถานที่เกิด | อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม |
| ประวัติการศึกษา | วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ทุนสนับสนุนงานวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการ อ้อยและน้ำตาลทราย |