

ลักษณะเรืองแสงสีเขียวที่แสดงออกในไม้น้ำสวยงามสองชนิดโดยการส่งถ่ายยีน *gfp*
ด้วยอะโกรแบคทีเรียที่เริ่มเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย

Green Fluorescence Expression in Two Aquarium Plant Species by
Agrobacterium-Mediated *gfp* Gene Transferred into the Target Tissues

พนม กระจางพจน์ สอดสุข^{1/*} พลชาติ ผิวเณร^{2/} สุจิตรา เพชรคง^{2/}

สุรีย์พร เย็นสุวรรณ^{2/} จริญญา สุวรรณาคะ^{2/}

Panom Krachangpoj Sodsuk^{1/*} Ponlachart Pewnane^{2/} Sujitra Pechkong^{2/}

Sureeporn Yensuwan^{2/} Jarinya Suwannakha^{2/}

Received 1 Sep. 2024/Revised 18 Oct. 2024/Accepted 18 Oct. 2024

ABSTRACT

The development of plants containing novel characteristics can be done using gene transfer of the target gene into the plant genome. This study aimed to obtain information on the green fluorescence expression of the *gfp* gene in 2 aquarium plant species, *Anubias nana* and *Hygrophila difformis*. The Agrobacterium-mediated gene transfer was used to transfer the *gfp* gene and other necessary genes for the process of expression into the plant target tissues. Somatic callus was used as the target tissue for gene transfer in *A. nana*, while somatic callus and shoots were used in *H. difformis*. The results found that the transformation efficiency was 280 cells of the Agrobacterium with plasmid (pCAMBIA1304) inside per 1 µg of the plasmid used. The *gfp* gene with all necessary other genes was successfully transferred, confirmed by the blue spots by the GUS gene from histochemical analysis, the occurrence of the target 327 bp band of the *gfp* DNA by the PCR technique, and the *gfp* expression as green fluorescence of the GFP protein. However, in six-month-old T₁ plants produced from tissue culture from the original gene-transferred plantlets (T₀) of both *A. nana* and *H. difformis*, which the callus was used as the target tissue, did not show the *gfp* band, which was probably due to chimeras. But the T₁ of *H. difformis* that the shoot was used as the target tissue showed the *gfp* band. It can be concluded that callus should not be used as the target tissue for *gfp* gene transfer in these two aquarium plant species, whereas shoots can be used as the target tissue in *H. difformis*.

Keywords: green fluorescence; *gfp* expression; target tissue for gene transfer; aquarium plants

^{1/} ข้าราชการบำนาญ กรมประมง ถ. พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Retired government officer, Department of Fisheries, Phahonyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^{2/} กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง จ.ปทุมธานี 12120

^{2/} Aquaculture Genetics Research and Development Division, Department of Fisheries, Pathum Thani 12120, Thailand

* Corresponding author: panomks@yahoo.com

บทคัดย่อ

การพัฒนาพันธุ์ไม้ให้มีลักษณะแปลกใหม่ทำได้โดยใช้การส่งถ่ายยีนที่มีลักษณะต้องการเข้าสู่เซลล์จีโนมพืช จึงได้ศึกษาลักษณะเรืองแสงสีเขียวที่แสดงออกโดยยีน *gfp* ในไม้เนื้อ 2 ชนิด ได้แก่ อนุเบียสนานา (*Anubias nana*) และดาวกระจาย (*Hygrophila difformis*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นตัวกลางส่งถ่ายยีน *gfp* และยีนอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการแสดงออกของยีน *gfp* เข้าสู่เนื้อเยื่อโคมاتิกแคลลัสในอนุเบียสนานา ขณะที่ดาวกระจายใช้ทั้งเนื้อเยื่อโคมاتิกแคลลัสและเนื้อเยื่อต้นอ่อน ผลการศึกษา พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีนอยู่ที่ 280 เซลล์ของอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด (pCAMBIA1304) รับฝากไว้ในเซลล์ต่อปริมาณพลาสมิดที่ใช้ 1 ไมโครกรัม ยีน *gfp* พร้อมด้วยยีนอื่น ๆ ที่จำเป็นทั้งหมดได้รับการส่งถ่ายสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายสำเร็จ เนื่องจากการเกิดจุดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อจากปฏิกิริยาการติดสีน้ำเงินเนื่องจากยีน GUS การเกิดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *gfp* ขนาด 327 bp จากเทคนิคพีซีอาร์ และเกิดการแสดงออกของยีน *gfp* ด้วยการเรืองแสงสีเขียวจากโปรตีน GFP แต่ในไม้เนื้ออนุเบียสนานาและดาวกระจายรุ่นลูก (T₁) อายุ 6 เดือนที่ผลิตโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากไม้เนื้อแรกที่ได้รับการถ่ายฝากยีน (T₀) โดยใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* ซึ่งอาจเป็นเพราะการเกิดไคเมรา (chimera) แต่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* ในรุ่นลูกของดาวกระจายที่ใช้ต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย ดังนั้นการใช้แคลลัสจึงไม่เหมาะสมในการเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน *gfp* ในไม้เนื้อดังกล่าวทั้งสองชนิด ในขณะที่การใช้เนื้อเยื่อต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายมีความเหมาะสมในไม้เนื้อดาวกระจาย

คำสำคัญ: ลักษณะเรืองแสงสีเขียว; การแสดงออกของยีน *gfp*; เนื้อเยื่อเป้าหมายถ่ายยีน; ไม้เนื้อสวอยงาม

บทนำ

ไม้เนื้อสวอยงามสำหรับตกแต่งหรือประดับตู้ปลาเป็นพืชกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้รับความนิยมทั้งภายในและต่างประเทศ มูลค่าการส่งออกไม้เนื้อสวอยงามของไทยมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (อรุณี, 2563) ประเทศผู้ผลิตไม้เนื้อสวอยงามเพื่อการส่งออกรายใหญ่ ได้แก่ สิงคโปร์ มาเลเซีย และไทย (วิทยา และคณะ, 2540) ไม้เนื้อสวอยงามเพื่อการส่งออกที่น่าสนใจได้แก่ อนุเบียสนานา (*Anubias nana*) และ ดาวกระจาย (water wisteria, *Hygrophila difformis*) กำลังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ

การผลิตไม้เนื้อเพื่อการจำหน่ายจำเป็นต้องมีคุณภาพดี ปราศจากโรค มีปริมาณมากเพียงพอและได้มาตรฐานตามที่ตลาดต้องการ นอกจากนี้ ความหลากหลายและแปลกใหม่ในรูปลักษณะที่ปรากฏสามารถเพิ่มมูลค่าของไม้เนื้อให้สูงขึ้นได้ (พลชาติ และคณะ, 2562; สุจิตรา และคณะ, 2563) ได้มีแนวความคิดที่จะพัฒนาไม้เนื้อให้มีความแปลกใหม่โดยใช้เทคนิคสมัยใหม่ เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ การส่งถ่ายยีน (gene transfer) ที่ทำให้เกิดลักษณะแปลกเข้าสู่เซลล์จีโนมพืช นิยมใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลาง (Agrobacterium-mediated) เนื่องจากมีอัตราการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอของยีนที่ปลูกถ่ายต่ำ สามารถปลูกถ่ายยีนขนาดใหญ่ได้ดี ใช้ชุดของยีนจำนวนน้อย มีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูง และต้นทุนต่ำ (Perez-Pineiro et al., 2012)

การส่งถ่ายยีนเพื่อทำให้สิ่งมีชีวิตเรืองแสงได้เป็นความแปลกใหม่และน่าสนใจ ได้มีการนำยีนที่ทำให้เกิดการเรืองแสง *gfp* ซึ่งเป็นยีนในเซลล์ของแมงกระพรุนชนิด *Aequorea victoria* ทำหน้าที่ควบคุมการผลิตโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein, GFP) มาใช้ในการส่งถ่ายยีน

อย่างแพร่หลาย ข้อดีของการส่งถ่ายยีน *gfp* คือสามารถตรวจสอบได้ในเซลล์สภาพมีชีวิต และตรวจสอบได้โดยตรงจากการสังเกตการเรืองแสงของโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากยีนโดยไม่ต้องใช้สาร substrate หรือการย้อมสีซึ่งอาจทำลายเซลล์ได้ ส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายสำหรับการถ่ายฝากยีนต้องเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristic tissue) จึงจะสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้ เช่น เนื้อเยื่อส่วนปลายรากและใบอ่อน ยอดต้นอ่อน และแคลลัส (callus) ที่เป็นเอ็มบริโอจินิก (embryogenic) หรือโซมาติกแคลลัส (somatic callus) เป็นต้น (ศิริวรรณ, 2550) ซึ่งนิยมใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายเนื่องจากเป็นเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ยังไม่มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อหรือส่วนต่าง ๆ ของพืช สามารถชักนำได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชเกือบทุกชนิด มีความเหมาะสมในการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียในทุกเซลล์ในแคลลัสมีพันธุกรรมเหมือนต้นพ่อแม่ เมื่อปลูกถ่ายยีนแล้วสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นสมบูรณ์ได้เป็นจำนวนมาก และสามารถอธิบายถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีนได้ (Li et al., 2003)

เนื่องจากอนุเบียสนานาและดาวกระจายเป็นไม้น้ำสวยงามเป็นที่ต้องการของตลาดเพื่อการส่งออก การพัฒนาให้ไม้น้ำดังกล่าวมีลักษณะแปลกใหม่โดยสามารถเรืองแสงได้นั้นจะทำให้มูลค่าการตลาดเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีนเรืองแสงของยีน *gfp* ในไม้น้ำสวยงาม ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายในอนุเบียสนานาและดาวกระจาย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาพันธุ์ไม้น้ำให้มีลักษณะการเรืองแสงได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการค้าขายไม้น้ำสวยงามที่มีความแปลกใหม่ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ดำเนินการที่กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำจ.ปทุมธานี ในห้องปฏิบัติการระบบปิด ตามระเบียบวิธีการศึกษาวิจัยสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม และอยู่ในความควบคุมดูแลของคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน กรมประมง

1. การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมาย

1.1 เตรียมต้นอ่อน สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้น้ำอนุเบียสนานาตามวิธีการของสุจิตรา และคณะ (2551) และดาวกระจาย ตามวิธีของสุรางค์ และสุจิตรา (2551) เพื่อให้ได้จำนวนต้นอ่อนเพียงพอสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

1.2 เตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

เตรียมโซมาติกแคลลัสเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในข้อ 1.1 เพื่อให้เจริญเป็นโซมาติกแคลลัสตามวิธีการของสุรีย์พร และคณะ (2563) และทดลองใช้เนื้อเยื่อต้นอ่อน โดยไม่ผ่านขั้นตอนการชักนำแคลลัส เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการส่งถ่ายยีนในไม้น้ำดาวกระจายด้วย

2. ขั้นตอนกระบวนการส่งถ่ายยีน

2.1 เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียและพลาสมิด

ดำเนินการตามวิธีของพลชาติ และคณะ (2562) และ สุจิตรา และคณะ (2563) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียชนิด *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (ElectroMax™, Invitrogen Life Technologies, Crop., U.S.A) ทำการเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่พร้อมรับพลาสมิด (plasmid) หรือ competent cells ตามวิธีการในเอกสารกำกับการใช้ (Invitrogen Life Technologies, Crop. U.S.A) ด้วยการนำเชื้อที่เก็บแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิประมาณ 4 °ซ. แล้วนำ

เชื้อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB (Luria bertani broth; tryptone 10 ก./ล. yeast extract 5 ก./ล. และ NaCl 5 ก./ล.) ที่เติมยา Rifampicin 50 มก./ล. และปรับ pH 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าสารความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. และทำการเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1304 (Marker Gene Technologies Inc., U.S.A) ซึ่งเป็น binary vector ขนาด 12,362 bp (base pair) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มก. ที่มีลำดับดีเอ็นเอในส่วน T-DNA ซึ่งมียีนควบคุมการสร้างโปรตีนเรืองแสง *gfp* (*mgfp5*) ยีนโปรโมเตอร์ (promoter gene) CaMV35S ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Kanamycin R (KanR) และ Hygromycin R (HygR) เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gusA* (GUS) เป็นยีนรายงานผล (reporting gene)

2.2 นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย (transformation)

ดำเนินการตาม พลชาติ และคณะ (2562) และ สุจิตรา และคณะ (2563) โดยนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เชื้ออะโกรแบคทีเรียด้วยวิธี electroporation ซึ่งเป็นการกระตุ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้า 2 กิโลโวลต์ ความต้านทาน 200 โอห์ม ความจุไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด โดยใช้เครื่อง electroporation (BTX electro cell manipulator 600, U.S.A) เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ผ่านการทำ electroporation ในอาหารเหลว SOC (super optimal broth with catabolite repression) ปริมาตร 1 มล. จากนั้นย้ายปริมาตรทั้งหมดไปเลี้ยงบนอาหาร ซึ่งเป็นอาหารกึ่งแข็งสูตร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน เพื่อใช้คัดเลือกเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pCAMBIA1304 นับจำนวนโคโลนีของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เจริญขึ้นบนอาหารเพื่อนำไปคำนวณประสิทธิภาพการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (transformation efficiency; EDVOTEK, 2024) นำโคโลนีเดียวที่เจริญบนอาหารไปเลี้ยงขยายในอาหารเหลว LB เพื่อให้ได้เชื้ออะโกรแบคทีเรียจำนวนเพียงพอ

2.3 ถ่ายยีน *gfp* เข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายที่เตรียมไว้

โดยมีขั้นตอนดำเนินการเริ่มต้นจากตัดแบ่งชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 ให้มีขนาดประมาณ 0.5 ซม. ทำการเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ในอาหารเหลวสูตร LB แล้ววัดระดับการเจริญของอะโกรแบคทีเรียโดยการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร (optical density, O.D.₆₀₀) ด้วยเครื่อง spectrophotometer เมื่ออะโกรแบคทีเรียเจริญถึงระดับ log phase (O.D.₆₀₀ = 1.0–1.2) นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแล้วนำไปเปลี่ยนถ่ายอาหารเหลวสูตร LB ที่ผสมสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ และผสมสาร celite (SiO₂) 5 มก./มล. เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายให้เกิดบาดแผล นำชิ้นเนื้อเยื่อเป้าหมายแช่ลงในเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ผสมสาร acetosyringone นาน 30 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงร่วมกันบนอาหารกึ่งแข็งสูตร LB นาน 5 วัน นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมาแช่ในอาหารเหลวสูตร LB ที่ผสมยา cefotaxime 400 มก./ล. นาน 10 นาทีเพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียและกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ยังหลงเหลืออยู่ซ้ำอีกโดยนำชิ้นเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ผสม cefotaxime 200 มก./ล. นาน 7 วัน

2.4 คัดเลือกเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ได้รับการถ่ายยีน

นำเนื้อเยื่อแคลลัสของอนุเบียสนานาไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (N6-benzyl adenine) และ NAA (naphthalene acetic acid) ส่วนแคลลัสของไม้ไผ่ดาวกระจายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. ซึ่งมีผลกระตุ้นให้แคลลัสดาวกระจายเจริญเป็นต้นอ่อน ผสมยาปฏิชีวนะฮัยโกรามัยซิน 30 มก./ล. ทั้งในอาหารเลี้ยงทั้ง 2 พืช เพื่อเป็นตัวคัดเลือก

สำหรับไม้ตัดดาวกระจายที่เนื้อเยื่อเป้าหมายเป็นต้นอ่อน คัดเลือกโดยนำต้นอ่อนที่กำลังจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียแล้วไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (สร้างค์และสุจิตรา, 2551) และผสมยาปฏิชีวนะฮัยโกรมัยซินเข้มข้น 15 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25-30 °ซ. และเก็บข้อมูลจำนวนเนื้อเยื่อที่รอดตายและเจริญเป็นต้นอ่อนหลังจากเลี้ยงนาน 30 วัน โดยเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตายในอาหารคัดเลือก เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่มียีน HygR ที่ต้านยาฮัยโกรมัยซิน ทำให้สามารถคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้

3. ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนและลักษณะแสดงออกของยีน *gfp* ในเนื้อเยื่อ

3.1 GUS histochemical analysis

ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนจากการแสดงออกของยีน GUS (*gusA*) ซึ่งเป็นยีนรายงานผลที่อยู่ในพลาสมิด pCAMBIA1304 โดยนำเนื้อเยื่อส่วนลำต้นและใบ (ของเนื้อเยื่อไม้ถ่ายยีนที่เจริญเป็นต้นอ่อน) ไปแช่ในน้ำยาย้อมสีเนื้อเยื่อ X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-glucuronide) โดยใช้ชุดย้อมสีเนื้อเยื่อพืชสำเร็จรูป β -glucuronidase reporter gene staining kit (Sigma-Aldrich, U.S.A) โดยเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน GUS จะติดสีน้ำเงิน

3.2 พีซีอาร์ (PCR)

ตรวจสอบยีน *gfp* ที่ปรากฏโดยแถบดีเอ็นเอขนาด 327 bp บนเจลลัน (agarose gel) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อไม้ที่ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี CTAB ของ Doyle and Doyle (1987) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ตามที่ พลชาติ และคณะ (2562) รายงานไว้ ได้แก่ Forward (5'-ACT ACA AGA CAC GTG CTG AAG-3') Reverse (5'-GGG CAG ATT GTG TGG AC-3')

โดยมีองค์ประกอบในการทำพีซีอาร์ คือ 10 pg DNA template, 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.2 μ M forward และ reverse primer, 1 unit *Taq* DNA polymerase (Promega) และอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ คือ ที่ 95 °ซ. นาน 5 นาที แล้วเข้าสู่รอบปฏิกิริยา denaturation ที่ 94 °ซ. นาน 0.5 นาที annealing ที่ 56 °ซ. นาน 0.5 นาที และ extension ที่ 72 °ซ. นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และรอบสุดท้ายที่ 72 °ซ. นาน 5 นาที หลังจากนั้นก็จึงนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วไปแยกขนาดโดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 327 bp ของยีน *gfp*

3.3 การเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (inverted fluorescent microscope)

ตรวจสอบการเรืองแสงของโปรตีน GFP ในเนื้อเยื่อไม้ถ่ายยีน โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อส่วนใบและต้นของต้นอ่อนไม้ที่ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและต้นปกติไปตรวจสอบการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ บันทึกภาพการเรืองแสงสีเขียวที่เกิดจากโปรตีน GFP

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ประสิทธิภาพการถ่ายฝากพลาสมิดที่มียีน *gfp* เข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

การถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่มียีน *gfp* เข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย ด้วยวิธี electroporation ใช้พลาสมิดในปริมาณ 5 ไมโครกรัม ได้อะโกรแบคทีเรียที่รับฝากพลาสมิด รวม 1,400 โคโลนี (Figure 1) สำหรับขั้นตอนการถ่ายฝากพลาสมิด ได้ใช้ปริมาตรสุดท้ายจากการถ่ายฝากทั้งหมดไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการเจือจาง พบว่า มีประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีน 280 เซลล์/ไมโครกรัม ซึ่งคำนวณตามวิธีของ EDVOTEK (2024)

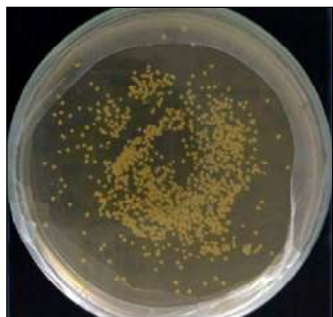
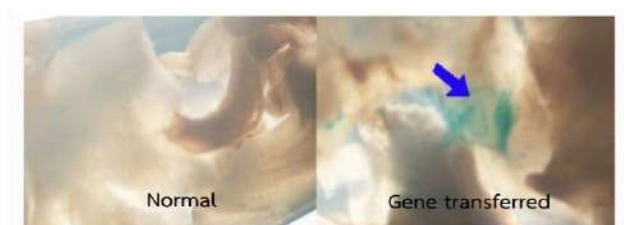


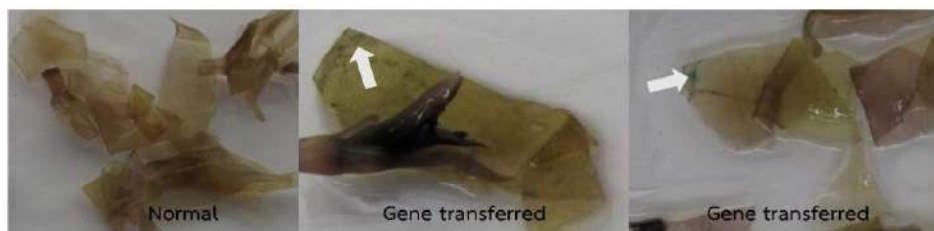
Figure 1 Colonies of *Agrobacterium* with plasmid pCambia 1304 transformed by electroporation

2. ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนโดย GUS histochemical analysis

การตรวจสอบผลโดยการแสดงออกของยีน GUS (*gusA*) ซึ่งเป็นยีนรายงานผลที่อยู่ในพลาสมิด pCambia1304 พบว่า ต้นอณูเบียสชุดที่ได้รับการถ่ายฝากยีนเกิดจุดสีน้ำเงินขึ้นที่เนื้อเยื่อส่วนลำต้นและใบ ขณะที่ต้นอณูเบียสปกติไม่เกิดจุดสีน้ำเงิน (Figure 2) ส่วนไม้หน้าดาวกระจายที่ได้รับการถ่ายฝากยีนสู่เนื้อเยื่อทั้ง 2 แบบ (แคลลัส และต้นอ่อน) พบว่า เกิดจุดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อทั้งส่วนใบและลำต้น ขณะที่ต้นปกติไม่มีจุดสีน้ำเงิน (Figure 2)



Anubias nana;
with **callus** as the target tissue used for gene transfer



Hygrophila difformis;
with **callus** as the target tissue used for gene transfer



Hygrophila difformis;
with **shoots** as the target tissue used for gene transfer

Figure 2 GUS histochemical analysis reporting gene transferred into target tissues of two aquarium plants, the callus of *Anubias nana* and the callus and shoots of *Hygrophila difformis*. The blue markings or spots, pointed by the blue and white arrows, confirmed the reporting gene *gusA* (GUS) together with the others including the *gfp* gene having been transferred into the plant tissue

การตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน จากการแสดงออกของยีนรายงานผล *gusA* ที่ถ่ายฝากไปพร้อมกับยีน *gfp* เพื่อยืนยันผลสำเร็จของการส่งถ่ายยีนเป้าหมาย *gfp* เข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อเป้าหมาย สามารถตรวจสอบการแสดงผลออกได้โดยตรงบนเนื้อเยื่อพืช ยีนรายงานผล *gusA* เป็นยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ β -glucuronidase ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสาร X-Gluc จะเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์อินโดลิล (indolyl derivatives) ได้ตะกอนสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืช การตรวจสอบการแสดงผลออกของยีน GUS จึงเป็นวิธีที่ง่าย และมีความเฉพาะเจาะจง (Chalfie et al., 1994) จากผลการตรวจสอบ พบว่า ไม้หน้ำอนุเบียสนานาและดาวกระจายที่ผ่านการถ่ายฝากยีนทั้งที่ใช้เนื้อเยื่อแคลลัสและต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย เกิดจุดสีน้ำเงินขึ้นที่เนื้อเยื่อทั้งส่วนลำต้นและใบ ขณะที่ไม้หน้ำปกติไม่เกิดจุดสีน้ำเงิน (Figure 2) เป็นการยืนยันว่า T-DNA ที่มียีน GUS พร้อมด้วยยีนเป้าหมาย *gfp* ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pCAMBIA1304

ได้รับการถ่ายฝากเข้าไปในดีเอ็นเอของไม้หน้ำที่ศึกษาทั้งในอนุเบียสนานาที่ใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย และดาวกระจายที่ใช้ทั้งแคลลัสและต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย

3. ตรวจสอบยีนเป้าหมาย *gfp* ในดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

การตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สังเคราะห์ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน *gfp* ที่มีขนาด 327 bp พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 bp ในไม้หน้ำที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ทั้งอนุเบียสนานาที่ใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย และดาวกระจายที่ใช้แคลลัสและต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย ขณะที่ต้นปกติทุกตัวอย่างไม่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าว (Figure 3) ผลการตรวจสอบไม้หน้ำที่ได้รับการถ่ายฝากยีนรุ่นแรก (T_0) นี้ เป็นการยืนยันว่ายีน *gfp* ได้ถูกส่งถ่ายเข้าไปในดีเอ็นเอของไม้หน้ำทั้ง 2 ชนิด ทั้งการใช้เนื้อเยื่อแคลลัสหรือต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายสำเร็จแล้ว

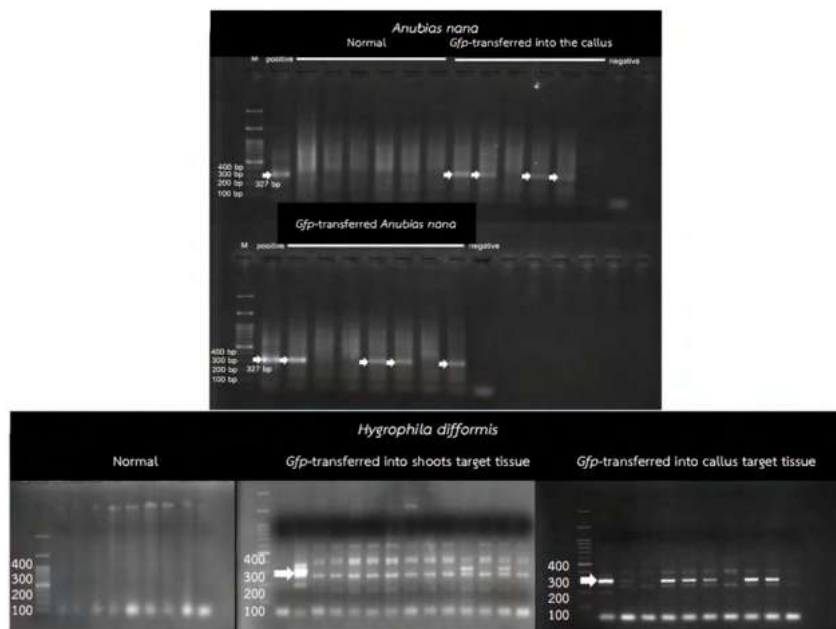


Figure 3 Analysis of *gfp* gene fragment in *Anubias nana*, with callus as the target tissue of *gfp*-transfer, and *Hygrophila difformis*, with shoots and callus as the target tissues of *gfp*-transfer. The bands being pointed by the white arrows are the 327 bp DNA bands of the gene *gfp* having been transferred into the plant target tissue

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้วิธีพีซีอาร์ตรวจสอบยีน *gfp* ในรุ่นลูก (T_1) ซึ่งเป็นต้นไม้ น้ำ T_0 อายุ 6 เดือน ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 327 bp ในออนูเบียสนานาและดาวกระจายรุ่นลูกที่ใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย แต่พบในดาวกระจายที่ใช้ต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย (Figure 4) การที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอนี้ น่าจะเป็นผลจากการเกิดโคเมรา (chimera) ซึ่ง พลชาติ และคณะ (2562) อธิบายว่า การเกิดโคเมราเนื่องจากในระหว่างกระบวนการถ่ายยีนสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายของพืชนั้น มีทั้งเซลล์เนื้อเยื่อที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายฝากยีนอยู่ด้วยกัน เป็นเหตุให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีโอกาสได้รับการปกป้องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมียืนต้านยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ใช้ในการคัดเลือกอยู่ด้วย จึงทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนรอดตายจากการคัดเลือก เมื่อเจริญเป็นต้นพืชจึงไม่มียีนเป้าหมายอยู่ในจีโนม (Flachowsky et al., 2008; Wang et al., 2008) จากการใช้ทั้งแคลลัสและต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายของดาวกระจายทำให้เข้าใจว่า โคเมรา มีโอกาสเกิดกับเนื้อเยื่อแคลลัสมากกว่าต้นอ่อนที่ใช้ถ่ายยีน (สุจิตรา และคณะ, 2563) ปรากฏการณ์ที่สันนิษฐานว่าเกิดโคเมราในพืชถ่ายฝากยีน เช่น รายงานของ Dong and McHughen (1993) ที่ศึกษาในพืช flax (*Linum usitatissimum*) พบว่า พืชถ่ายฝากยีนรุ่นลูกไม่ได้รับยีนเป้าหมาย แม้ว่าในรุ่นพ่อแม่ตรวจพบการแสดงออกของยีน GUS และเกิดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายเมื่อทำพีซีอาร์ส่วนในการถ่ายยีนสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของไม้ น้ำกลุ่มใบพาย (*Cryptocoryne* spp.) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียของนุซจรี (2552) ได้รายงานการตรวจสอบการยังคงมีอยู่ของยีนที่ส่งถ่าย โดยการนำแต่ละยอดที่ตรวจสอบด้วยพีซีอาร์แล้วว่ามียีนที่ส่งถ่ายไปชักนำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นอีก แล้วทำการตรวจสอบด้วยพีซีอาร์เป็นครั้งที่สอง พบว่า มีบางยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป และสรุปว่าการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อไม้ น้ำ *C. affinis*

อาจไม่ได้เกิดขึ้นทุกเซลล์ เป็นผลให้ต้นไม้น้ำที่ได้มีลักษณะเป็นโคเมรา

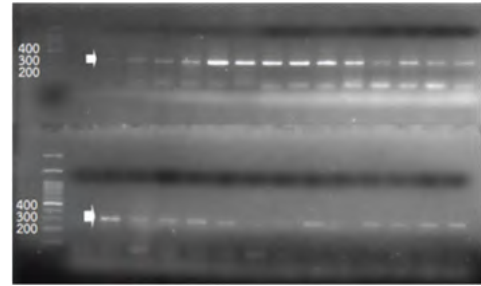


Figure 4 Analysis of *gfp* gene fragment in the T_1 of *Hygrophila difformis* which were the 6 months old plants produced by tissue culture from the original gene-transferred planlets (T_0) that the shoot had been used as the target tissue. The analysis presented the target 327 bp bands of the transferred *gfp* (pointed by the white arrows)

4. การเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จากลักษณะการเรืองแสงสีเขียวของโปรตีนเรืองแสง GFP พบว่า ชูตที่ได้รับการถ่ายฝากยีน *gfp* ทั้งของออนูเบียสนานา และดาวกระจายที่ถ่ายฝากยีนสู่เนื้อเยื่อทั้ง 2 รูปแบบ (แคลลัสและต้นอ่อน) มีการเรืองแสงสีเขียว ขณะที่ชูตต้นปกติไม่มีการเรืองแสง (Figure 5)

5. ผลการศึกษาในภาพรวม

ผลที่ปรากฏจากการศึกษาทั้งหมด สามารถสรุปประเด็นรายละเอียดได้ตาม Table 1 จากการศึกษาที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* ในรุ่นลูก (T_1) ของทั้งไม้ น้ำออนูเบียสนานาและดาวกระจายที่ใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายถ่ายยีน น่าจะเป็นผลจากการเกิด โคเมรา จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อป้องกันการเกิดโคเมรา หรือปรับเทคนิคดำเนินการเพื่อให้การถ่ายโอนยีนประสบผลสำเร็จดียิ่งขึ้น และ

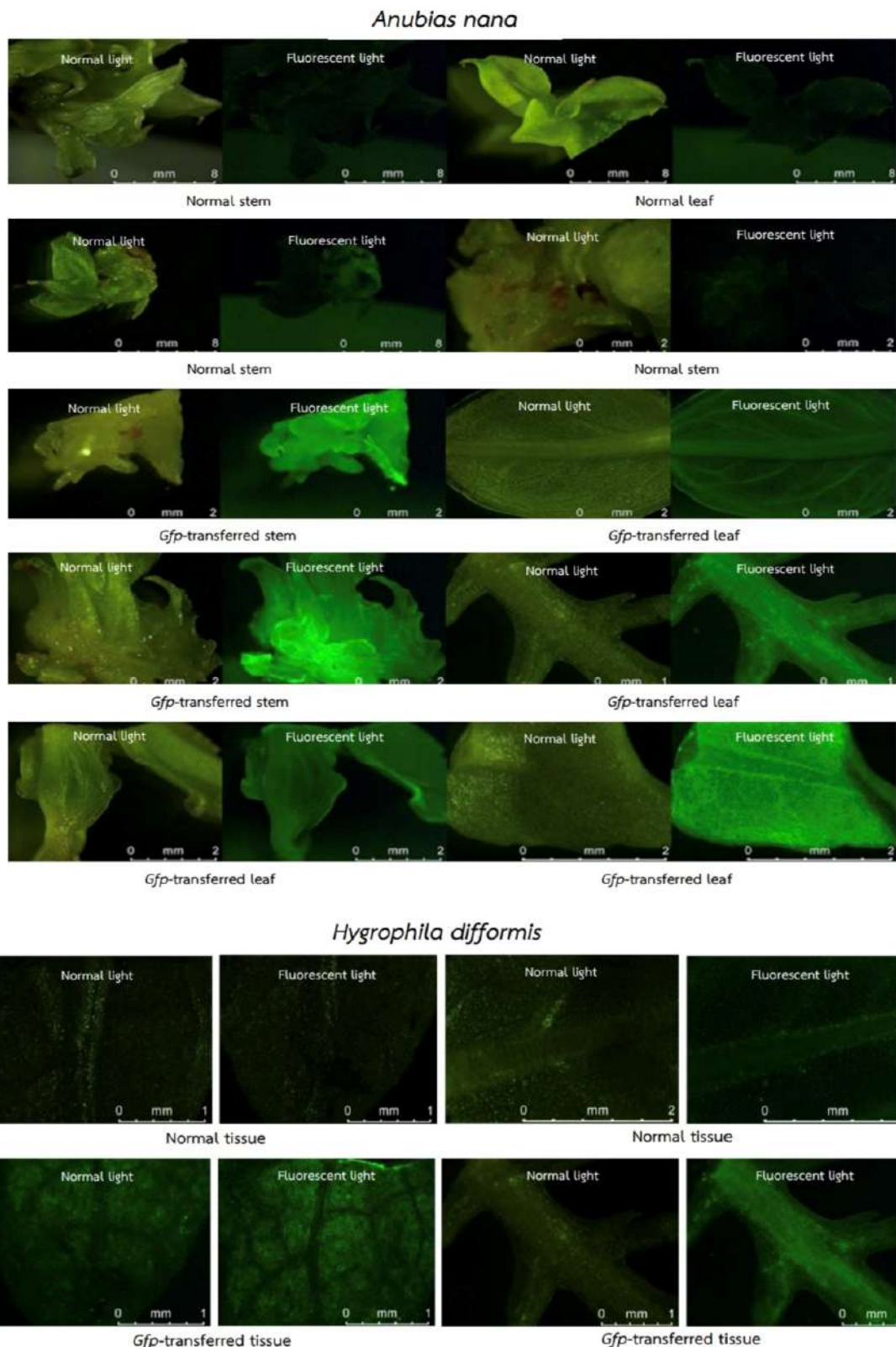


Figure 5 Normal and *gfp*-transferred tissues of two aquarium plants, *Anubias nana* and *Hygrophila difformis*, seen under normal and fluorescent lights sourced from inverted fluorescent microscope. The green fluorescence of the GFP protein is presented in the *gfp*-transferred tissues of the two plants

Table 1 Conclusive results from the study

Generation of the gene-transferred plantlets	Examining of the transferred genes and the expression	Aquarium plant species and target tissues of gene transfer		
		<i>Anubias nana</i>	<i>Hygrophila difformis</i>	
		Callus	Callus	Shoot
T ₀ (the original gene-transferred shoots/plantlets)	GUS	yes ^{1/}	yes	yes
	PCR	yes	yes	yes
	Fluorescent	yes	yes	yes
T ₁ (the 6 months old plants produced by tissue culture from the original gene-transferred plantlets)	PCR	no ^{2/}	no	yes

^{1/} yes = positive result

^{2/} no = negative result

และสำหรับไม้น้ำดาวกระจาย เนื้อเยื่อที่เหมาะสม
สำหรับใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายถ่ายยีนน่าจะเป็น
ต้นอ่อนมากกว่าแคลลัส เนื่องจากสามารถตรวจพบแถบ
ดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 327 bp ของยีน *gfp* ในไม้น้ำ
ดาวกระจายทั้งรุ่นแรก (T₀) และรุ่นลูก (T₁)

ผลการศึกษาโดยรวมสามารถพัฒนาและใช้
เป็นแนวทางของการศึกษาในไม้น้ำชนิดอื่น ๆ ที่
น่าสนใจต่อไป อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้
ที่จะนำไปสู่การพัฒนาลักษณะเรืองแสงให้เป็นลักษณะ
แปลกใหม่ในไม้น้ำสวยงาม ที่ส่วนใหญ่ใช้ประดับ
ตกแต่งในตู้ปลา ซึ่งโดยปกติต้องมีการติดตั้ง
อุปกรณ์ไฟฟ้าเพื่อให้แสงสว่าง ที่มีใช้จำเป็นต่อการ
สังเคราะห์แสงของไม้น้ำเท่านั้น แต่ยังจำเป็นเพื่อช่วย
ให้ไม้น้ำสวยงามโดดเด่นยิ่งขึ้นอีกด้วย โดยเฉพาะใน
พื้นที่อับแสงหรือในเวลากลางคืน ก่อนหน้านี้นี้ได้มี
รายงาน ว่า นักวิจัยสามารถถ่ายโอนดีเอ็นเอของเชื้อ
เห็ดราบางชนิดที่มีสารเรืองแสงเข้าสู่ต้นใบยาสูบแล้ว
ทำให้มันเรืองแสงได้ในที่มืด เปล่งแสงสีเขียวสดใส
และยังคงอยู่ตลอดวงจรชีวิตจนโตเต็มวัย รวมถึงยัง
สามารถทำให้ไม้ดอก เช่น พืชเนย กุหลาบ และ

แฟงพวย เรืองแสงได้เช่นเดียวกัน (Mitouchkina et
al., 2020) จากงานวิจัยโดย ยีโก (2564) ได้แสดง
ลักษณะการแสดงออกที่เสถียร (stable expression)
ของยีนเรืองแสง *gfp* ในต้นพืชเนยที่ได้รับการถ่ายยีน
(transgenic) ซึ่งปรากฏว่าในส่วนใบของต้นพืชเนยที่
ได้รับการถ่ายยีนแล้วมีการเรืองแสงถาวร ดังนั้นหาก
สามารถทำการปรับแต่งพันธุกรรมไม้น้ำสวยงามให้มี
ลักษณะเรืองแสงที่เสถียร หรือเรืองแสงถาวรได้ในต้นไม้น้ำ
ที่โตแล้ว จนพัฒนาเป็น ลักษณะทางการค้าที่ตลาด
ต้องการได้ ก็จะเป็นการส่งเสริมธุรกิจและตลาดไม้น้ำ
สวยงามให้ขยายวงกว้างขึ้น

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะการแสดงออกของ
ยีนเรืองแสง *gfp* ในไม้น้ำสวยงาม 2 ชนิด คือ
อนุเบียสนานา และดาวกระจาย โดยผ่านการส่งถ่าย
ยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย พบว่า
สามารถส่งถ่ายยีนเรืองแสง *gfp* ได้สำเร็จในแคลลัส
ของอนุเบียสนานา แคลลัสและต้นอ่อนดาวกระจาย
ซึ่งยืนยันผลได้จากการพบว่ามีแสดงออกของยีน

GUS ด้วยการติดสีน้ำเงินให้เห็นในเนื้อเยื่อไม้เนื้อ และจากการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 327 bp ของยีนเป้าหมาย *gfp* ที่ฝากถ่ายสู่จีโนมไม้เนื้อทั้งสองชนิด และที่สำคัญที่สุดคือ การเรืองแสงสีเขียวของโปรตีน GFP ซึ่งเป็นผลผลิตจากการแสดงออกของยีน *gfp* ที่ส่งถ่ายสู่เนื้อเยื่อเป้าหมายของไม้เนื้อทั้งสองชนิด ภายใต้ประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีน ซึ่งคิดเป็นจำนวนเซลล์หรือโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียที่รับฝากพลาสมิดไว้ได้ ที่จำนวน 280 เซลล์ ต่อ ปริมาณพลาสมิดที่ใช้ 1 ไมโครกรัม แต่ในไม้เนื้ออ่อนลูก (T₁) อายุ 6 เดือนที่ผลิตโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากไม้เนื้ออ่อนแรกที่ได้รับการถ่ายฝากยีน (T₀) พบว่า ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* ในรุ่นลูกของอนุเบียดสนานาและดาวกระจายที่ใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายของการถ่ายยีนในรุ่นแรก ซึ่งน่าจะเนื่องมาจากการเกิดไคเมรา อย่างไรก็ตามพบแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* ในรุ่นลูกของดาวกระจายที่ใช้ต้นอ่อนเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายของการถ่ายยีน ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อป้องกันการเกิดไคเมราในไม้เนื้อที่ใช้แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายถ่ายยีน และควรทดลองใช้เนื้อเยื่อต้นอ่อนเป็นเป้าหมายการถ่ายยีนในไม้เนื้ออนุเบียดสนานา เพื่อพัฒนาลักษณะเรืองแสงเป็นลักษณะแปลกใหม่ให้ประสบผลสำเร็จ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณจากแผนบูรณาการส่งเสริมการวิจัยและพัฒนา กรมประมง ภายใต้แผนงานวิจัย “การถ่ายฝากยีนในไม้เนื้อสวยงามเพื่อพัฒนาลักษณะพันธุ์ที่แปลกใหม่” ขอขอบคุณข้าราชการและเจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิชาการและกลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์ กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง เป็นกำลังสำคัญในการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยเฉพาะ ดร.ศรียุทธ สอดสุข อดีตผู้อำนวยการกองวิจัยและ

พัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง คุณประโยชน์ที่เกิดจากการตีพิมพ์เผยแพร่บทความวิจัยนี้ ขออุทิศให้นายพลชาติ ผิวเณร อดีตหัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์ กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ

เอกสารอ้างอิง

- นุชจรี ทัดเศษ. 2552. การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้สกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 134 หน้า.
- พลชาติ ผิวเณร พนม กระจำพจน์ สอดสุข สุจิตรา เพชรคง สุริย์พร เย็นสุวรรณ และจริญญา สุวรรณนาคะ. 2562. การถ่ายฝากยีนเรืองแสง *gfp* ในไม้เนื้ออนุเบียดสนานาโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. หน้า 117-128. ใน: รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2562. เอกสารฉบับที่ 5/2562. กลุ่มบริหารงานวิจัย กองแผนงาน กรมประมง. 590 หน้า.
- ยี่ไถ่ ทัพพะทัต. 2564. การสร้างเทคโนโลยีฐานในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ. แหล่งข้อมูล: <https://www.nstda.or.th/nac/2021/2021/03/05/agro05-gene-editing/index.html>. สืบค้น: 1 สิงหาคม 2567.
- วิทยา หวังเจริญพร กำชัย ลาวัณยุทธิ กาญจนรี พงษ์ฉวี และชัชวาลย์ จตุพร. 2540. การจัดตั้งและเพาะเลี้ยงพรรณไม้เนื้อ. สถาบันพัฒนาปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำ กรมประมง. 44 หน้า.
- ศิริวรรณ บุรีคำ. 2550. การเตรียมเนื้อเยื่อพืชสำหรับการถ่ายยีน. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การถ่ายยีนเข้าสู่พืช. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุจิตรา เพชรคง นพพร สิทธิเกษมกิจ สุรางค์ สมโนจิตรภรณ์ และชมพูนุช มรรคทรัพย์. 2551. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไม้เนื้ออนุเบียดสนานาโดยการฉายรังสีแกมมา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2551. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง. 19 หน้า.
- สุจิตรา เพชรคง พลชาติ ผิวเณร พนม กระจำพจน์ สอดสุข สุริย์พร เย็นสุวรรณ และจริญญา สุวรรณนาคะ. 2563.

- การถ่ายฝากยีนเรืองแสง *gfp* ในไม้น้ำดาวกระจายโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2563. กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง. 22 หน้า.
- สุรางค์ สุมโนจิตรภรณ์ และสุจิตรา เพชรคง. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปรับปรุงพันธุ์พรรณไม้น้ำ. เอกสารการฝึกอบรมหลักสูตร การเพาะพันธุ์และปรับปรุงพรรณไม้น้ำสวยงาม. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง. 38 หน้า.
- สุรีย์พร เอ็นสุวรรณ พนม กระจำพจน์ สอดสุข พลชาติ ผิวเนตร สุจิตรา เพชรคง และจริญญา สุวรรณนาคะ. 2563. พัฒนาวิธีการเลี้ยงโฮมาติกแคลล์สของไม้น้ำสวยงามเพื่อการถ่ายฝากยีน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2563. กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง. 19 หน้า.
- อรุณี รอดลอย. 2563. การบริหารจัดการ การผลิต และการตลาดพรรณไม้น้ำสวยงามในประเทศไทยเพื่อการส่งออก และการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน. แหล่งข้อมูล: https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200611094900_1_file.pdf. สืบค้น: 1 สิงหาคม 2567.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263(5148): 802-805.
- Dong, J.Z. and A. McHughen. 1993. Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: Incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Science*. 91(2): 139-148.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- EDVOTEK. 2024. How to calculate transformation efficiency. The Biotechnology Education Company. Available at: <https://www.edvotek.com/how-to-calculate-transformation-efficiency>. Accessed: October 9, 2024.
- Flachowsky, H., M. Riedel, S. Reim and M.V. Hanke. 2008. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11(1): 26-40.
- Li, D.D., W. Shi and X.X. Deng. 2003. Factors influence *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the pTA 29-barnase gene. *Tree Physiology*. 23(17): 1209-1215.
- Mitiouchkina, T., A.S. Mishin, L.G. Somermeyer, N.M. Markina, T. V. Chepurnyh, E.B. Guglya, and K.S. Sarkatsyan. 2020. Plants with genetically encoded autoluminescence. *Nature Biotechnology*. 38(8): 944-946.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum*. 15(3): 473-479.
- Perez-Pineiro, P., J. Gago, M. Landin and P.P. Gallego. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat: General overview and new approaches to model and identify the key factors involved. pp. 3-26. In: *Transgenic Plants-Advances and Limitations*. Y.O. Ciftci (ed.). InTech Open Access Publisher.
- Wang, W., C. Wang, B.L. Huang and B. Huang. 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lesquerella fendleri* L., a potential new oil crop with rich lesquerolic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 92: 165-171.