ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร	โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

The Transformation of *Green Fluorescent Protein* Gene into *Cryptocoryne* spp. *via Agrobacterium tumefaciens*

นามผู้วิจัย นางสาวนุชจรี ทัดเศษ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ปาริชาติ เบิร์นส, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ลพ ภวภูตานนท์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

The Transformation of *Green Fluorescent Protein* Gene into *Cryptocoryne* spp. *via Agrobacterium tumefaciens*

โดย

นางสาวนุชจรี ทัดเศษ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2552

นุชจรี ทัดเศษ 2552: การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 134 หน้า

การชักนำเนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* 2 ชนิดคือ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' ให้เกิดยอดหลายยอด (multiple shoots) เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน ทำได้โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA โดย *C. affinis* ใช้ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน *C. wendtii* 'Brown' ใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' โดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ซึ่งมียีน *β-glucuronidase* (*gus*) และยีน *green fluorescent protein* (*mgfp*5) เป็นยีนรายงานผลและยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน คือ การใช้เนื้อเยื่อปลายยอดยาว 5 มิลลิเมตร ทำบาดแผลที่เนื้อเยื่อโดยการผ่าครึ่งตามยาวแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 5 วินาที ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *C. affinis* ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ส่วน *C. wendtii* 'Brown' ใช้สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ และกระตุ้นเชื้อในช่วงของการปลูกเชื้อและการเลี้ยงร่วมโดยใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และใช้เวลาในการปลูกเชื้อนาน 2 ชั่วโมง และการเลี้ยงร่วมนาน 3 วัน จากนั้นนำยอดมากำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* และคัดเลือกบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากตามที่กล่าวแล้ว และเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดที่เจริญได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ พบว่ามียอด ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนของ *C. affinis* เกิดขึ้นจำนวน 35 ยอด และ *C. wendtii* 'Brown' จำนวน 6 ยอด ซึ่งเมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามียีนอยู่แตกต่างกันในแต่ละสายยอด แสดงว่าการถ่ายยีนครั้งนี้ได้ต้นที่มีลักษณะเป็น chimera และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo (excitation 488 nm และ emission 510 nm) พบว่ายอดของ *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนมีการเรืองแสงสีแดงและสีเหลือง แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียว

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nootjaree Tudses 2009: The Transformation of *Green Fluorescent Protein* Gene into *Cryptocoryne* spp. *via Agrobacterium tumefaciens*. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 134 pages.

The multiple shoots of 2 *Cryptocoryne* species, *C. affinis* and *C. wendtii* 'Brown' were induced from apical shoot explants for using as plant material for genetic transformation. The shoot explants were cultured for 5 days in MS liquid medium supplemented with 0.01 mg/l TDZ and 0.3 mg/l BA then transferred onto MS solid medium for 4 weeks in which, for *C. affinis,* 4 mg/l BA was added and for *C. wendtii* 'Brown', 1 mg/l BA was added. Thereafter, the procedures of gene transformation in *C. affinis* and *C. wendtii* 'Brown' using *Agrobacterium tumefaciens* were optimized. Two strains of *A. tumefaciens* harboured the pCAMBIA1304 which contained *β-glucuronidase* (*gus*) and *green fluorescent protein* (*mgfp5*) genes as reporter genes and *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) gene as a plant selectable marker gene were compared. The 5 mm long *in vitro* shoots wounded by cut in half lengthwise followed by 5 sec sonication were suitable the target tissues. The suitable stain of bacterial for *C. affinis* transformation was *A. tumefaciens* strain EHA105 and for *C. wendtii* 'Brown' was the strain AGL-1. *Agrobacterium* was also activated by100 µM acetosyringone during inoculation and co-cultivation steps.
The optimal period for inoculation was 2 hr and for co-cultivation was 3 days. The bacteria was then eliminated from the explants followed by selected on multiple shoots induction media stated above and supplemented with 5-10 mg/l hygromycin and 300 mg/l cefotaxime for 6 weeks.
The survived shoots were then cultured on the same medium but without any antibiotic.
The number of 35 putative transformed shoots of *C. affinis* and 6 of *C. wendtii* 'Brown' were recovered. After subjected to PCR analysis of *gus, mgfp5* and *hpt* genes, the result revealed the difference in the presence of the transgenes in putative transformants which confirmed that the putative transformed shoots were chimeras. Latter, the putative transformed shoots were investigated for the expression of *mgfp5* gene using stereo microscope (excitation at 480 nm and emission at 510 nm) and only red and yellow fluorescence were observed but not the green fluorescence.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. ปาริชาติ เบิร์นส และ ผศ.ดร. ลพ ภวภูตานนท์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสมอมา ทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ธนวรรณ พาณิชพัฒน์ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. กุลนาถ อบสุวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อบรรลือ คุณแม่ฉบับ ทัดเศษ และน้องๆ รวมทั้งทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีตลอดมา

นุชจรี ทัดเศษ

กุมภาพันธ์ 2552

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญตาราง (ต่อ)

สารบัญภาพ

สารบัญภาพ (ต่อ)

สารบัญภาพ (ต่อ)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BA	=	6-benzyllamiopurine
TDZ	=	thidiazuron
GFP	=	green fluorescent protein
GUS	=	β-glucuronidase
CaMV	=	*Cauliflower mosaic virus*
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
hpt	=	hygromycin phosphotransferase
PCR	=	polymerase chain reaction
RNase	=	ribonuclease
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution

การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

The Transformation of *Green Fluorescent Protein* Gene into *Cryptocoryne* spp. *via Agrobacterium tumefaciens*

คำนำ

พรรณไม้น้ำนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีอนาคตดีเพราะเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ปัจจุบันปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำสวยงามในประเทศไทยได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นการเลี้ยงปลาหรือการจัดตู้ปลาเพื่อเป็นงานอดิเรก หรือการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ จึงทำให้ปริมาณการซื้อ-ขายปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำสวยงามมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นธุรกิจพรรณไม้น้ำสวยงามจึงเติบโตควบคู่กับธุรกิจปลาสวยงามอย่างต่อเนื่อง โดยตลาดส่งออกพรรณไม้น้ำสวยงามที่สำคัญของประเทศไทยส่วนใหญ่อยู่ในแถบยุโรป ญี่ปุ่น และอเมริกา และเป็นที่คาดการณ์กันว่ามูลค่าการส่งออกจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สุกัญญา, 2548) พรรณไม้น้ำที่มีการผลิตเพื่อใช้ประดับตู้ปลาและเพื่อการค้านั้นมีมากกว่า 250 ชนิด ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศในทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกาใต้ และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับประเทศไทยซึ่งจัดอยู่ในประเทศเขตร้อนก็เป็นแหล่งกำเนิดพรรณไม้น้ำสวยงามหลายชนิดเช่นกัน ภูมิอากาศของประเทศไทยเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพรรณไม้น้ำ จึงมีการเจริญเติบโตเร็วและสามารถขยายพันธุ์ง่ายทำให้มีการผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกมาก (ปรัชญา, 2537)

อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังมีการนำเข้าพรรณไม้น้ำจากต่างประเทศมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นสินค้าส่งออก เนื่องจากพรรณไม้น้ำที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยยังไม่มีความหลากหลายและไม่มีความแปลกใหม่เพียงพอที่จะตอบสนองความต้องการของตลาด ดังนั้นแนวทางแก้ไขปัญหาข้างต้นจึงมีแนวคิดนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงลักษณะพรรณไม้น้ำให้มีสีสันที่สวยงาม มีความแปลกใหม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งจะเป็นการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของสินค้าเกษตรของไทย

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำ โดยใช้ยีนควบคุมการสร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (*Green Fluorescent Protein* gene : *mgfp5*) และยีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล โดยเลือกใช้วิธีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก สำหรับพรรณไม้น้ำที่สนใจศึกษาคือ พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* เนื่องจากมีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย (นิรนาม, 2550) ตลาดมีความต้องการสูง (สุกัญญา, 2548) และเพื่อให้ได้เทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการถ่ายยีนที่น่าสนใจในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะและใช้ยีนควบคุมการสร้างโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (*green fluorescent protein* gene : *mgfp5*) และยีน β-*glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล

การตรวจเอกสาร

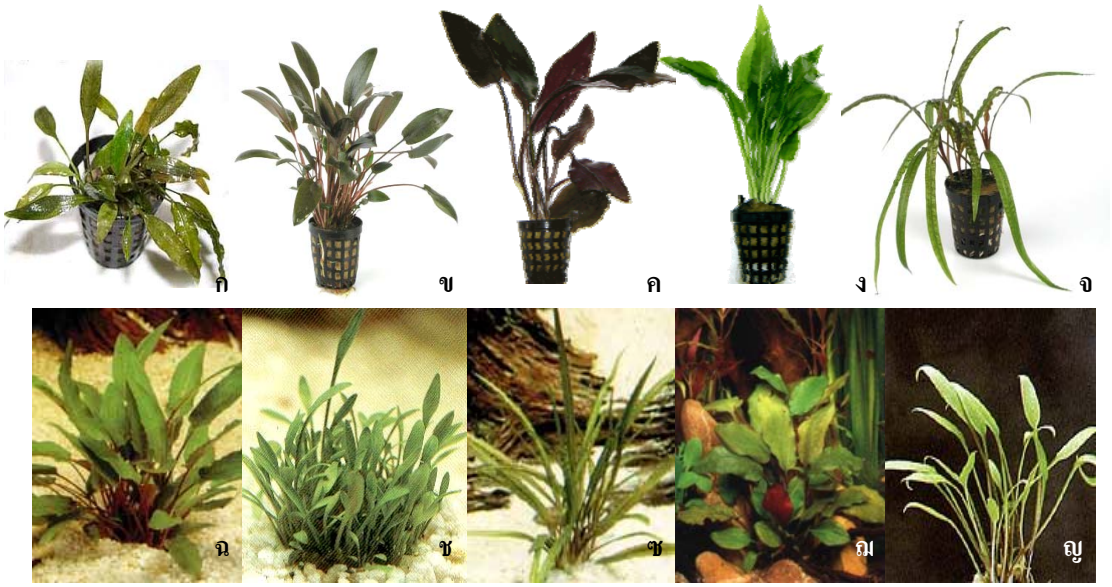
1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* เป็นพืชน้ำล้มลุก ใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ Araceae (สุชาดา, 2543) จัดอยู่ในกลุ่มพืชน้ำครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian plants) ซึ่งเป็นกลุ่มพรรณไม้น้ำที่เจริญเติบโตขึ้นตามแหล่งน้ำตื้นๆ ส่วนบนจะอยู่ผิวน้ำ (สุกัญญา, 2548) ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกับพรรณไม้น้ำประเภทพืชโผล่ขึ้นเหนือน้ำ (emerged plant) โดยบริเวณโคนต้นจะมีเนื้อเยื่อโปร่งสีขาวเรียกว่า aerenchymatous tissue ทำหน้าที่เก็บสะสมอากาศเพื่อช่วยในการหายใจ (สุชาดา, 2543) ลักษณะเด่น คือ ลำต้นเป็นเหง้าฝังอยู่ใต้ดินและมีไหลสั้นๆ ส่วนลำต้นเหนือดินเป็นกอประกอบด้วยโคนก้านใบหุ้มประกบกันไว้ พืชในสกุลนี้พบว่าบางชนิดมีความสูงตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ขึ้นไปและบางชนิดอาจสูงได้มากกว่า 50 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) แตกออกเป็นกระจุกรอบข้อแทงขึ้นมาจากพื้นดิน เส้นใบเรียงตัวขนานกัน มีทั้งแบบปลายใบมนและปลายใบแหลม บางชนิดจะเป็นหยักลอนคลื่น ใบยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร ก้านใบเป็นโพรงยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร มีสีสันสวยงามแล้วแต่ชนิด เช่น สีน้ำตาลแดง แดงเข้ม เขียวอมแดง เขียวอ่อน เขียวมรกต หรือเขียวอมเทา ดอกมีสีเหลืองออกเป็นช่อยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร ชูขึ้นมาเหนือน้ำ มีสีเหลืองและมีกาบสีม่วงหุ้มประดับช่อคล้ายหลอด ส่วนปลายของดอกจะบิดเป็นเกลียวแผ่ออกคล้ายปากแตร ส่วนโคนโป่ง พรรณไม้น้ำสกุลนี้พบว่ามีมากกว่า 60 ชนิด กระจายตามแถบประเทศอินเดียจนถึงคาบสมุทรอินโดจีน เช่น ประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา หมู่เกาะปาปัวนิวกินี รวมทั้งประเทศไทยด้วย

สำหรับพรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทยที่อยู่ในสกุลนี้ ได้แก่ บอนน้ำ (*C. balansae*) บอนแดง (*C. blassii*) ใบพาย (*C. cordata*) และวาน้ำ (*C. ciliata*) เป็นต้น (พัฒน์, 2549) (ภาพที่ 1) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศ ในธรรมชาติมักพบเจริญอยู่ตามแหล่งน้ำทั่วไปที่มีน้ำไหลเอื่อยๆ เช่น หนอง บึง หรือบริเวณที่มีน้ำขังตื้นๆ และมีน้ำชื้นแฉะ (สุกัญญา, 2548) สำหรับการขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ในสภาพธรรมชาติจัดเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ได้ช้าจะเกิดต้นอ่อนขึ้นปีละ 1-3 ต้นเท่านั้น (ปรัชญา, 2537)

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 2 ชนิด คือ *C. affinis* (คริป) และ *C. wendtii* 'Brown' (ใบพายศรีราชา) เป็นพรรณไม้น้ำที่นิยมนำมาใช้ในการจัดตู้ปลามากและเป็นชนิดหลักที่มีการส่งออกต่างประเทศ โดยมีลักษณะเฉพาะคือ *C. affinis* เป็นพรรณไม้น้ำที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ซึ่งมีลำต้นเป็นเหง้าและมีไหลสั้นๆ อยู่ใต้ดิน ใบแตกจากรอบข้อแทงเป็นกระจุกขึ้นมาจากพื้น ลักษณะใบยาวคล้ายหอก เส้นใบเรียงขนาน ใบมีสีน้ำตาล ใต้ใบสีแดงสด แผ่นใบย่นเป็นรอยลึก ดอกออกเป็นช่อชูขึ้นเหนือน้ำ รูปร่างเป็นหลอดปลายบานคล้ายปากแตร หุ้มด้วยกาบใบประดับ การใช้งานพรรณไม้น้ำชนิดนี้นิยมนำมาใช้ตกแต่งตู้ปลาบริเวณกลางตู้เพราะเจริญเติบโตช้า ลักษณะเด่นคือ เมื่อปลูกเลี้ยงในตู้ปลาระยะหนึ่งใบจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการตัดแยกไหลที่แตกต้นใหม่ไปปักชำ หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของต้น (ภาพที่ 1ก) (ปรัชญา, 2537; พัฒน์, 2549)

C. wendtii 'Brown' เป็นพรรณไม้น้ำที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศศรีลังกา มีลักษณะทั่วไปคล้ายพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ชนิดอื่นๆ แต่ลักษณะเด่นคือ ใบและก้านใบเป็นสีเขียวอมแดง ลักษณะใบยาว ปลายใบและโคนใบแหลม ขอบใบเป็นรอยหยัก (ภาพที่ 1ข) (พัฒน์, 2549)



ภาพที่ 1 พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* (ก) *C. affinis* (ข) *C. wendtii* 'Brown' (ค) *C. blassii* (ง) *C. ciliate* (จ) *C. balansae* (ฉ) *C. wendtii* 'Green' (ช) *C. parva* (ซ) *C. tonkinensis* (ฌ) *C. cordata* และ *C. lucens*

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne*

การขยายพันธุ์ไม้น้ำสามารถทำได้ 2 ลักษณะ คือ การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศและการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่เนื่องจากการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศอาจต้องเสี่ยงกับคุณภาพของพันธุ์ไม่สม่ำเสมอ ลักษณะรูปร่างไม่คงที่และระยะเวลาของการเจริญเติบโตช้าทำให้ไม่ได้รับความนิยมจากเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยง ดังนั้นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสามารถนำส่วนต่างๆ ของพืชมาชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่ไม่กลายพันธุ์ ปลอดโรค ได้ผลผลิตสม่ำเสมอ สะดวกต่อการดูแลรักษา จึงเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์ไม้น้ำเพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออก ปัจจุบันสถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมงได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนกระทั่งประสบความสำเร็จสามารถขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ได้แล้ว จำนวน 4 ชนิด คือ บอนน้ำหรือใบพายหมวกเหล็ก (*C. balansae*) ผมหอม (*C. tonkinensis*) บอนแดง (*C. blassii*) และใบพายศรีราชา (*C. wendtii*) (สุกัญญา, 2548)

อย่างไรก็ตาม การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* จำเป็นต้องศึกษาหาความเหมาะสมระหว่างชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกับชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงซึ่งมีรายงานการเพาะเลี้ยงหลายรายงาน เช่น กาญจนรี และคณะ (2542) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของผมหอม (*C. tonkinensis* Gagnepain) บนอาหารแข็งสูตร MS โดยการใช้ BA ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมียอดเกิดขึ้นเฉลี่ย 4.50 ยอดต่อชิ้น

มณีรัตน์ และ อรุณี (2542) ได้นำเนื้อเยื่อต้นใบพายศรีราชา (*C. wendtii*) โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนของลำต้นที่มีตายอดติดอยู่มาเพาะเลี้ยง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนใบพายศรีราชาที่มีความแข็งแรงสมบูรณ์ในปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) ส่วนการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จะไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนต้นอ่อน แต่การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ลงในอาหารสังเคราะห์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้การเกิดต้นอ่อนน้อยลง ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Kane *et al.* (1999) ที่เติม BA เพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุดคือ 7 ยอดต่อชิ้นและมีจำนวนยอดมากกว่าการใช้ BA ร่วมกับ NAA แต่ในการทดลองของ Mo and Jiang (2003) พบว่า

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ตายอดของ *C. wendtii* นั้นคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้สาเหตุที่สูตรอาหารที่เหมาะสมต่างกัน แม้ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงพืชชนิดเดียวกันอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมอื่นๆ ของการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เช่น ความเข้มแสง ช่วงแสง คุณภาพแสง อุณหภูมิของห้องเพาะเลี้ยง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลอย่างมากต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อด้วยเช่นกัน แต่ในรายงานที่อ้างถึงนี้ไม่ได้กล่าวถึงรายละเอียดของสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้อย่างชัดเจนจึงไม่สามารถระบุเหตุผลได้

สำหรับต้นใบพายเขาใหญ่ (*C. balansae*) นั้น มณีรัตน์ (2546) ได้เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ตายอดเกิดยอดใหม่ที่มีความแข็งแรงและสมบูรณ์จำนวนมาก แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ให้สูงขึ้นกลับพบว่ามีแนวโน้มทำให้การเกิดยอดใหม่ลดลง

วันเพ็ญ (2547) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นบอนแดง (*C. blassii*) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA หรือ kinetin ร่วมกับ NAA พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ต้นบอนแดงเกิดยอดได้มากที่สุดคือ 5.9 ยอดต่อชิ้น สำหรับ *C. cordata* นั้น รสา และคณะ (2548) ได้นำชิ้นส่วนตายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวทำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 4 ยอดต่อชิ้น ส่วน Kane *et al.* (1990) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *C. lucens* พบว่าอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) ที่เติม BA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุด คือ 7 ยอดต่อชิ้น

จากรายงานผลการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Cryptocoryne* ที่กล่าวแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่า ในบางชนิดใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวก็ประสบผลสำเร็จ แต่ในบางชนิดอาจต้องใช้ออกซินความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมด้วย และนอกจากนี้ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *C. affinis* ซึ่งเป็นชนิดหนึ่งที่ใช้ในงานวิจัยนี้

3. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนในพืชเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากทั้งในด้านการศึกษาเพื่อให้เกิด

ความเข้าใจถึงกลไกการทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนการต่าง ๆ ทางชีววิทยาและเพื่อประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ในพืชชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถสร้างพืชพันธุ์ใหม่ให้ได้ลักษณะที่ดีตามความต้องการ โดยใช้ระยะเวลาอันสั้นและพืชต้นใหม่ยังคงลักษณะเดิมที่ดีเอาไว้ โดยสามารถย้ายยีนจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน (นิตย์ศรี และ สัมพันธ์, 2548) ซึ่งปัจจุบันการถ่ายยีนเข้าสู่พืชทำได้สำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด เช่น ออนซิเดียม (Liau *et al.*, 2003) ข้าวฟ่าง (Gao *et al.*, 2005) และถั่วลิสง (Anuradha *et al.*, 2006) เป็นต้น

เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืช แบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ

3.1 การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)

เป็นการส่งถ่ายยีนให้เซลล์พืชโดยส่งผ่านสารพันธุกรรมหรือการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยไม่ต้องอาศัยพาหะ (vector) เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ เช่น การใช้แรงดัน การใช้กระแสไฟฟ้า การใช้สารเคมี หรือการใช้สภาวะทางกายภาพต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์เป้าหมายได้ วิธีที่นิยมกันมาก ได้แก่ การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment, gene gun, microprojectile bombardment) และการถ่ายยีนโดยวิธี electroporation (สนธิชัย และ เสริมศิริ, 2549) ผู้ปฏิบัติจึงควรเลือกใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและเหมาะสมกับการปฏิบัติงานและงบประมาณที่มีอยู่

3.2 การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผลซึ่ง *Agrobacterium tumefaciens* เมื่อเข้าบุกรุกเข้าสู่พืชทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) เรียกว่า crown gall disease ซึ่งมีสาเหตุมาจากพลาสมิดที่พบใน *A. tumefaciens* เรียกว่า Tumour inducing plasmid (Ti plasmid) ซึ่งมีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายเข้าไปและแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของพืชอย่างถาวร เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า transferred DNA (T-DNA) ส่งผลให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ผิดปกติเกิดเป็นลักษณะปุ่มปม (สุรินทร์, 2545) โดย de la Riva *et al.* (1998) อธิบายว่ากระบวนการส่งถ่าย T-DNA จาก *A. tumefaciens* ไปยังเซลล์พืชขึ้นอยู่กับปัจจัย

ต่างๆ คือ 1) การเข้าไปยึดเกาะกับพืชบริเวณที่เกิดบาดแผล 2) การชักนำให้เกิดการทำงานของยีนในแบคทีเรีย 3) การผลิตสารประกอบต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการส่งถ่าย T-DNA และ 4) การแทรกตัวของ T-DNA ซึ่งมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินเข้าไปในจีโนมของพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ ซึ่งขอบเขตของ T-DNA ที่ถูกส่งถ่ายไปยังเซลล์พืชนั้นกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) จำนวน 25 คู่เบสทั้ง 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) โดยกระบวนการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีนที่เรียกว่า *virulence* อยู่ในส่วนของ Ti plasmid ซึ่งกระบวนการส่งถ่ายนี้จะถูกกระตุ้นด้วยสาร phenolic compound จากพืช คือ acetosyringone (AS) หรือ α-hydoxyl- acetosyringone ซึ่งพืชสร้างและปลดปล่อยออกมาเมื่อพืชเกิดบาดแผล ดังนั้นต่อมานักวิทยาศาสตร์จึงได้ทำการศึกษากลไกการถ่ายยีนเหล่านี้และพบว่าสามารถตัดหรือต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออกแล้วใส่ยีนใหม่ที่เป็นประโยชน์แทนที่ยีนก่อโรคได้ เมื่อพืชถูกบุกรุกด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมนี้แล้ว ยีนที่เป็นประโยชน์ก็จะถูกถ่ายเข้าสู่พืชได้ (สนธิชัย และ เสริมศิริ, 2549)

กระบวนการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้นสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติระหว่างเชื้อกับพืชอาศัย โดยการถ่ายยีนวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษใดๆ ที่มีราคาแพง จึงเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง (สนธิชัย และ เสริมศิริ, 2549) แต่อาจมีข้อจำกัดในเรื่องของความจำเพาะเจาะจงของเชื้อกับพืชอาศัย (Finer and Finer, 2000) ความรุนแรงของเชื้อและวิธีการทำให้เกิดบาดแผลบริเวณเซลล์เป้าหมาย (สนธิชัย, 2543) การถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* นี้แต่เดิมจะได้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น ซึ่งในธรรมชาติเชื้อ *A. tumefaciens* นี้ไม่สามารถเข้าบุกรุกในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ (Hooykass and Schilperoort, 1992) โดย Vasil (1994) ได้รายงานความสำเร็จการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวและธัญพืชโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* แต่พบว่ายังมีปัญหาเนื่องจากพืชเหล่านี้จะไม่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Agrobacterium* เพราะไม่ได้เป็นพืชอาศัย แต่ในปัจจุบันการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ได้รับการพัฒนาจนประสบผลสำเร็จทำให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้หลายชนิด ซึ่ง Smith and Hood (1995) ได้รายงานถึงการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาโดยลำดับ โดยเริ่มจากการเลือกเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการถ่ายยีน เช่น เนื้อเยื่อเจริญ และการปรับสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* เช่น งานวิจัยของ Sheikhdeslam and Weeks (1987) ได้เติมสาร acetosyringone ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อและระหว่างการ co-cultivation (Owens and Smigocki, 1988; Godwin *et al.*,1991) เพื่อกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ใน Ti-plasmid ของเชื้อ *Agrobacterium* ให้ทำงานได้ดีขึ้น

ปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายรายงาน เช่น Hiei *et al.* (1994) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว และ Men *et al.* (2003) ที่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *Den. nobile* ได้สำเร็จเมื่อเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* และในอาหารสำหรับการ co-cultivation เช่นกัน และจากงานทดลองของ รักชนก (2549) สามารถถ่ายยีน *CPACO* antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลและบอม 17 ได้สำเร็จโดยการทำบาดแผลบนเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงนาน 6 วินาที แล้วจึงปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* นาน 60 นาที และ co-cultivation บนอาหารแข็ง VW ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ นาน 2 วัน

4. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

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

4.1 พันธุกรรมพืช ชิ้นส่วนของพืช อายุของเนื้อเยื่อพืช และระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม

ในประเด็นพันธุกรรมพืชที่มีผลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้น เป็นประเด็นที่มีการกล่าวถึงกันค่อนข้างมาก ตัวอย่างเช่น การทดลองของ Saharan *et al.* (2004) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว 2 สายพันธุ์ คือ HKR-46 และ HKR-126 โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA1301 เป็นพาหะมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าข้าวสายพันธุ์ HKR-126 มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ HKR-46 (44.4 และ 28.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) หลังจากคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก นาน 4-6 สัปดาห์ พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ HKR-126 สูงถึง 52.6 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองของ Danilova and Dolgikh (2005) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวโพด 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ R91 และสายพันธุ์ลูกผสม A188xR91 โดยใช้

A. tumefaciens สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pBI121 เป็นพาหะมียีน *nptII* เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินนั้น ภายหลังจากการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนนาน 1 เดือน พบว่าแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม A188xR91 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าข้าวโพดสายพันธุ์ R91 (4.7 และ 4.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

สำหรับเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนนั้นพืชแต่ละชนิดมีเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนแตกต่างกันไป ซึ่งเนื้อเยื่อที่นิยมนำมาใช้ในการถ่ายยีนได้แก่ คัพภะอ่อน (immature embryo) แคลลัส เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด แผ่นใบ และราก เป็นต้น (Nandakumar *et al.*, 2004) เช่น การทดลองของ Somleva *et al.* (2002) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่โซมาติกเอมบริโอและแคลลัสของหญ้า switchgrass พบว่าการใช้โซมาติกเอมบริโอเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายนั้นให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าการใช้แคลลัสและยังพบอีกว่าการใช้แคลลัสยังพบการพัฒนาของเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกด้วย แต่อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้เนื้อเยื่อที่มีซอกมุมหรือที่มีขนาดเล็กมาก เพราะวิธีการถ่ายยีนโดยวิธีนี้จำเป็นต้องทำบาดแผลให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมายและต้องกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อภายหลังการถ่ายยีน เนื้อเยื่อขนาดเล็กทำให้เกิดการบอบช้ำได้ง่ายและเนื้อเยื่อที่มีซอกมุมมากทำให้การกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกในภายหลังทำได้ยากเช่นกัน (สนธิชัย และเสริมศิริ, 2549)

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

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* คือ วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายให้เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน โดยการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูง Potrykus (1990a) และ Potrykus

(1990b) รายงานว่าการเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีความแตกต่างจากพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากพืชใบเลี้ยงคู่เมื่อเกิดบาดแผลจะกระตุ้นให้มีการเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่เพื่อซ่อมแซมบริเวณที่เกิดบาดแผลได้ดี ทำให้ยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปมีโอกาสแทรกรวมกับจีโนมของพืชได้มากขึ้น แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะไม่มีการแบ่งเซลล์ใหม่บริเวณบาดแผล แต่ใช้วิธีการทำให้บริเวณที่เกิดบาดแผลเกิดการแข็งตัว (lignified) เพื่อลดการสูญเสียน้ำและเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชต่างๆ จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้พืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่ใช่พืชอาศัยของ *A. tumefaciens* และทำให้เชื้อเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ยาก

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

4.2 สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens*

ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่าง ๆ นั้นสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้จัดเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการดัดแปลงสายพันธุ์ *A. tumefaciens* ให้สามารถบุกรุกเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวก็ตาม แต่ในพืชแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* แตกต่างกัน โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่รุนแรงมากนั้นอาจไม่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องจากยีน *vir* ของเชื้อจะมีความจำเพาะต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของเนื้อเยื่อพืช โดย *A. tumefaciens* แต่ละสายพันธุ์จะมีระบบของ *virulence* ที่ต่างกัน (รักชนก, 2549) ยกตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ EHA105 จัดเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงมาก (hypervirulence strain) ที่ได้รับการพัฒนามาจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่บรรจุ Ti-plasmid คือ pEHA105 โดยพัฒนามาจาก pTiBo542ΔT-region ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิด succinamopine type (Hood *et al.*, 1993) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงและสามารถเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงคู่ได้หลากหลายชนิด (broad host range) โดยเฉพาะพืชในวงศ์ Solanaceae (solanaceous plant)

ส่วนสายพันธุ์ AGL-1 นั้นเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงมาก ที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงและสามารถเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงคู่ได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะพืชในวงศ์ crucifer (cruciferous plant) โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 นั้นพัฒนามาจาก

A. tumefaciens สายพันธุ์ EHA101 ที่บรรจุ Ti-plasmid คือ C58 pTiBo542 recA::bla, T-region deleted Mop (+) Cb (R) (Lazo *et al.*, 1991)

มีรายงานหลายฉบับได้ยืนยันผลดังกล่าว เช่น Cao *et al.* (1998) ได้เปรียบเทียบการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ EHA105 ที่มียีน *gus-int* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่บลูเบอรี่ (*Vaccinium* spp.) พบว่าสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ LBA4404 และในการทดลองของ Tsuyoshi *et al.* (2001) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ LBA4404 AGL-1 และ EHA105 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วอซูกิเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ทำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* มากกว่าการใช้สายพันธุ์ LBA4404 เนื่องจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงเป็นพิเศษ (hypervirulent) ที่ถูกพัฒนาส่วนของ Ti-plasmid ให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยที่กว้างมากขึ้นและมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น ต่อมา Yong *et al.* (2006) ได้ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมการในถ่ายยีนเข้าสู่ยอดและข้อของ *Melastoma malabathricum* และ *Tibouchina semidecandra* โดยใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ซึ่งประกอบด้วยยีน *mgfp*5 เป็นยีนรายงานผล พบว่าสายพันธุ์ LBA4404 ให้ผลดีที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ *M. malabathricum* ส่วนสายพันธุ์ EHA105 มีความเหมาะสมกับ *T. semidecandra*

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

ดังนั้นเพื่อให้การถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ให้ประสบความสำเร็จในพืชชนิดนั้นๆ ในกรณีที่ไม่เคยมีงานวิจัยควรทดสอบสายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อพืชชนิดที่จะถ่ายยีนนั้นๆ

4.3 ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens*

ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดย สุมนา (2550) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่หญ้ารูซี่ โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ กันโดยใช่ปริมาตรสารแขวนลอยเชื้อต่ออาหารเหลวสูตร MS ในช่วง 1:1 1:10 และ 1:20 พบว่า อัตรา 1:10 ทำให้ได้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุด โดยเกิดจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 1.83 จุดต่อน้ำหนักแคลลัส 1 กรัม

อย่างไรก็ตาม Humara *et al.* (1999) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Pinus pinea* L. โดยใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ คือ ระดับที่มีค่า OD_{600} ในช่วง 0.01-1.0 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเชื้อที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 ทำให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด แต่ในทางตรงกันข้ามระดับความเข้มข้นของเชื้อที่สูงขึ้นนี้กลับทำให้การเกิดยอดของเนื้อเยื่อพืชลดลงจาก 58 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งผลในลักษณะเดียวกันนี้พบในงานวิจัยของ Yan *et al.* (2000) ด้วยเช่นกันโดยพบว่า ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่มีค่า OD_{600} สูงขึ้นทำให้ความมีชีวิตของเนื้อเยื่อส่วนข้อของใบเลี้ยงของถั่วเหลืองลดลง

4.4 การเติมสาร acetosyringone

acetosyringone เป็นสารประกอบที่พืชสร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล สารชนิดนี้เป็นสารที่เชื้อ *A. tumefaciens* ต้องการเพื่อใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อปุ่มปม (Stachel *et al.*, 1985) สารนี้จะเข้าไปกระตุ้นการลอกรหัสของยีน *vir* ใน *A. tumefaciens* โดยทำงานร่วมกับ transmembrane receptor protein (Melchers *et al.*, 1989) แต่เนื่องจากในสภาพธรรมชาติพืชหลายชนิดไม่สามารถสร้างสารนี้ได้ในปริมาณที่มากพอและโดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่สามารถสร้างสาร acetosyringone ได้เองเมื่อเกิดบาดแผล ดังนั้นการเติมสาร acetosyringone ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ อาหารที่ใช้สำหรับการปลูกเชื้อ (inoculation) หรืออาหารที่ใช้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) (Hiei, *et al*., 1997) ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ให้มีการส่งถ่ายชิ้นส่วน T-DNA ได้ดีขึ้นทำให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงขึ้น (Sheikholeslam and Weeks, 1987) ซึ่งโดยทั่วไประดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone ที่นิยมใช้ในการกระตุ้นเชื้อเพื่อการถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่างๆ อยู่ในช่วง 100-200 ไมโครโมลาร์

(Mendes *et al.*, 2002 ; Nandakumar *et al.*, 2004; Saharan *et al.*, 2004) โดยมีงานวิจัยของ Nandakumar *et al.* (2004) ที่ศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Typha latifolia* ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 เป็นพาหะ และมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล จากผลการศึกษา พบว่าการเติมสาร acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนทำให้การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด พบว่าสาร acetosyringone ไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (Delbreil *et al.*, 1993) ข้าวสาลี (Cheng *et al.*, 1997) และข้าวบาร์เลย์ (Tingay *et al.*, 1997) และในส้มซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่มีรายงานว่าการเติมสาร acetosyringone เข้มข้น100 และ 200 ไมโครโมลาร์ นอกจากไม่มีผลในการช่วยประสิทธิภาพในการถ่ายยีนแล้วยังกลับพบว่า การไม่เติมสาร acetosyringone มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนดีกว่า (Almeida *et al.*, 2003) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้สาร acetosyringone จากภายนอกเมื่อรวมกับสารประกอบ phenolic ที่พืชสร้างขึ้นเอง อาจส่งผลไปลดความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชของเชื้อ *A. tumefaciens* ได้ ส่วนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวนั้น Lee *et al.* (2006) พบว่าการเติมสาร acetosyringone เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหญ้า orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) ทำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงถึง 56.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ระดับความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวเท่ากับ 28.3 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ และการไม่เติมสาร acetosyringone มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนเพียง 16.1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ดังนั้นควรทดสอบระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone ให้เหมาะสมในพืชแต่ละชนิดโดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนให้สูงขึ้น

4.5 การทำบาดแผลให้แก่ชิ้นส่วนพืช

ในการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้นการทำบาดแผลให้แก่ชิ้นส่วนพืชเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องทำเพื่อช่วยให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนให้สูงขึ้น เนื่องจากบาดแผลเป็นช่องทางสำหรับการเข้าบุกรุกพืชของเชื้อแบคทีเรีย และเป็นจุดที่จะทำให้เชื้อเข้าไปจับกับเนื้อเยื่อของพืชได้ง่ายขึ้น สำหรับการทำบาดแผลนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้มีดกรีดหรือตัดเนื้อเยื่อพืช การทำให้เกิดบาดแผลขนาดเล็กโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงโดยใช้เครื่อง sonicator และการใช้สารเคมี เช่น silicon carbide เป็นผลึกมีรูปร่างคล้ายเข็ม เป็นต้น การทำบาดแผลโดยการใช้

เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงนั้น Trick and Finer (1997) ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการทำบาดแผลโดยใช้เครื่อง sonicator เช่น เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงซึ่งทำให้เกิดบาดแผลบนเนื้อเยื่อพืช และเรียกเทคนิคนี้ว่า sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated tansformation (SAAT) เป็นวิธีการทำให้เกิดบาดแผลขนาดเล็กบนเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ *A. tumefaciens* ได้ทดลองในถั่วเหลือง (*Glycine max* Jack) ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* Bobwhite) และต้นสน white spruce (*Picea glauca*) เป็นต้น โดยใช้ระยะเวลาการใช้คลื่นเสียงไม่เกิน 100 วินาที ทดสอบกับเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ใบ คัพภะอ่อน ราก ลำต้น ปลายยอด และเซลล์แขวนลอย พบว่าการทำบาดแผลโดยวิธี SAAT สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนและพบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงขึ้น

ต่อมา Santarém *et al.* (1998) ได้ศึกษาการทำบาดแผลโดยวิธี SAAT บนเนื้อเยื่อใบเลี้ยงอ่อน (immature cotyledons) ของถั่วเหลืองที่ระยะเวลา 0.1-10 วินาที จากผลการทดลองพบว่า การทำบาดแผลโดยวิธี SAAT เป็นเวลา 2 วินาที ทำให้การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงที่สุด คือ 25.2 เปอร์เซ็นต์ และ Finer and Finer (2000) ทดสอบถ่ายยีน *green fluorescent protein* (*GFP*) เข้าสู่ใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pTB93F โดยนำใบอ่อนมาทำให้เกิดบาดแผลโดยวิธี SAAT ที่ระยะเวลา 1 วินาที พบว่าสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้ภายหลังจากการ sonicate นาน 7 ชั่วโมง ซึ่งจะปรากฏจุดเรืองแสงสีเขียวบนเนื้อเยื่อพืช แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองของ Meurer *et al.* (1998) พบว่าการทำบาดแผลโดยวิธี SAAT ในถั่วเหลือง 28 พันธุ์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนแต่มีผลทำให้การเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อลดลง แต่ยังไม่มีรายงานว่าการทำบาดแผลโดยวิธี SAAT มีผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน แต่จากงานวิจัยของ Humara *et al.* (1999) ซึ่งเปรียบเทียบวิธีการทำบาดแผลกับเนื้อเยื่อใบเลี้ยงของ *Pinus pinra* L. จำนวน 4 วิธี คือ การไม่ทำบาดแผล การใช้มีดกรีด การใช้เครื่องยิงอนุภาค และการใช้เครื่อง sonicator พบว่าการทำบาดแผลโดยวิธี sonicate ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ได้มากที่สุด แต่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อยที่สุด ดังนั้นควรหาวิธีการทำบาดแผลที่เหมาะสมเพื่อที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้

4.6 ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ (inoculation)

การปลูกเชื้อเป็นขั้นตอนที่ช่วยทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* ยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืชได้ (Yong *et al.*, 2006) ซึ่ง Ke *et al.* (2002) รายงานว่าระยะเวลาในการปลูกเชื้อมีผลต่อการ

แสดงออกของยีน *gus* โดยทดลองปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pAL155/pAL156 ให้ต้นอ่อนของข้าวบาร์เลย์ ใช้ระยะเวลานาน 0.5 4 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง ทำให้ประสิทธิภาพส่งถ่ายยีนต่ำมาก และ Wu *et al.* (2003) ได้ปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ให้กับคัพภะอ่อนของข้าวสาลี เป็นเวลา 0 0.25 0.5 1 2 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมงเหมาะสมในการปลูกเชื้อมากที่สุด พบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานขึ้น แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานเกินไปจะส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดต้นของพืชลดลง ส่วนในการทดลองของ Almeida *et al.* (2003) การปลูกเชื้อให้ใบเลี้ยงส้ม ที่ระยะเวลา 20 นาที สามารถพบการแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด

4.7 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อ (co-cultivation)

ระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อนั้นในพืชแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่างกัน ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการช่วยทำให้เกิดกลไกการส่งถ่ายยีนจาก *A. tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืช (Yong *et al.*, 2006) โดยทั่วไปจะใช้เวลาในการ co-cultivation ประมาณ 2-4 วัน Custis *et al.* (1999) รายงานว่าระยะเวลา co-cultivation ที่นานเกินไปจะทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* เจริญเติบโตคลุมเนื้อเยื่อพืชจนไม่สามารถกำจัดได้ นอกจากนี้การ co-cultivation ที่นานเกินไปอาจส่งผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อเกิดอาการ necrosis ได้ ซึ่งจากการทดลองของ Cervera *et al.* (1998) ได้ศึกษาระยะเวลา co-cultivation ที่นานขึ้นมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้นด้วย แต่ไม่ควรนานเกินไป ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มประมาณของเชื้อแบคทีเรียและลดประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดย Cao *et al.* (1998) กล่าวว่าปกติแล้วไม่แนะนำให้ co-cultivation นานเกิน 4 วันเพราะการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อพืชจะทำได้ยาก อาจส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตายได้

Lee *et al.* (2006) ได้ทดลองหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหญ้า orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) นาน 3 วัน มีประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวได้สูงที่สุดประมาณ 57.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระยะเวลา 5 1 และ 7 วัน พบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว เท่ากับ 48.9 40.2 และ 32.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากนี้ความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่พืชยังขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนและการบังคับให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช ชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสม อายุพืช สภาพแวดล้อมก่อนการคัดเลือก แสง แหล่งที่มาของชิ้นส่วน สภาพแวดล้อมสำหรับการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis หรือการพัฒนาเป็นต้น อาหาร วิธีการคัดเลือก สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ วิธีการวิเคราะห์ทางปริมาณและคุณภาพของพืชแปลงพันธุ์ เป็นต้น (Jacobsen, 1993)

5. รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ *A. tumefaciens*

ปัจจุบันได้มีรายงานผลการทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี่ยงเดี่ยวโดยใช้ *A. tumefaciens* ได้สำเร็จ เช่น ข้าว (Hiei *et al.*, 1994) กล้วย (May *et al.,* 1995) ข้าวโพด (Ishida *et al.*, 1996) หัวหอมหัวใหญ่ (Eady *et al*., 2000) ข้าวฟ่าง (Zhao *et al.*, 2000) ข้าวบาร์เลย์ (Trifonova *et al.*, 2001) ข้าวสาลี (Wu *et al.*, 2003) และหญ้า buffel (Batra and Kumar, 2003) เป็นต้น

รักชนก (2549) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA1301 โดยมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยใช้ transversely thin cell layers (tTCLs) ที่มีความหนา 0.2 มิลลิเมตร นำมา pre-culture นาน 3 วัน ในอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วคัดเลือกต่อในอาหารเหลวคัดเลือกสูตรเดิมนาน 2 เดือน ในการทดสอบได้เปรียบเทียบ 6 ปัจจัย พบว่าการนำเนื้อเยื่อเป้าหมาย tTCLs ที่มีความหนา 0.2 มิลลิเมตร มาทำบาดแผลโดยวิธี sonication ที่เวลา 6 วินาที ปลูกเชื้อที่มีความเข้มข้น $5x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรนาน 60 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) เป็นเวลา 2 วัน ซึ่งอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อและอาหารสำหรับ co-cultivation นั้นเติมสาร acetosyringone เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ วิธีการดังกล่าวนำมาใช้ถ่ายยีน antisense *CPACO1* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย พบว่ามีจำนวนต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนในพันธุ์ บอม 17 จำนวน 7 สายต้น และพันธุ์เอียสกุล จำนวน 3 ต้น ส่วนการถ่ายยีน antisense *CPACO2* พบว่ามีจำนวนต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนในพันธุ์ บอม 17 จำนวน 4 สายต้น และพันธุ์เอียสกุล จำนวน 3 ต้น

Eady *et al.* (2000) รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่หัวหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa* L.) โดยใช้คัพภะอ่อนเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pBIN *m-gfp-ER* ซึ่งมียีน *nptII* (*neomycin phosphotransferase* II) ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ geneticin และมียีน *mgfp5-ER* เป็นยีนรายงานผล พบว่าหลังจาก co-cultivation เป็นเวลา 5 วัน พบการแสดงออกของยีน *mgfp-ER* สูงที่สุดคือ 2.7 เปอร์เซ็นต์ และภายหลังการคัดเลือกสามารถยืนยันการมีอยู่ของยีนได้โดยวีธี PCR analysis และ Soutern hybridization

Chai *et al.* (2002) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Phaleanopsis* โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA44404 ซึ่งประกอบด้วยพลาสมิด pTOK233 ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและมียีน *hpt* ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin นำโปรโตคอร์มภายหลังการถ่ายยีนไปคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกนาน 2 เดือน แล้วนำโปรโตคอร์มที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกไปตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยใช้วิธี GUS histochemical assay พบว่าวิธีการทำบาดแผลโดยใช้ใบมีดผ่าตามขวางและใช้เข็มฉีดยาแทงโปรโตคอร์ม และเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* มีการแสดงออกของยีน *gus* และได้มีการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการถ่ายยีนอีกครั้งด้วยเทคนิค PCR และ Southern hybridization ต่อไป

Men *et al.* (2003) ได้ทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุล *Den. nobile* โดย *A. tumefaciens* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ EHA105 และสายพันธุ์ AGL-1 โดยใช้ binary vector เดียวกันคือ pCAMBIA1301 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก จากการทดลองสรุปปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนคือ การเพาะเลี้ยง PLBs ที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 4-6 มิลลิเมตร ร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 นาน 30 นาที (infection) แล้วจึง co-cultivation บนอาหารสูตร ½MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 2-3 วัน แล้วจึงคัดเลือกโปรโตคอร์มบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัม และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน วิธีนี้ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุดเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์

Batra and Kumar (2003) ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในหญ้า buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) หลังจากการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA1301 หรือ pCAMBIA2301 โดยใช้แคลลัสที่ได้จากส่วนของ embryogenic ปลูกเชื้อนาน 30 นาที พร้อมทั้งกระตุ้นด้วย acetosyringone ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์และ

co-cultivation เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวได้สูงที่สุดประมาณ 63.3 เปอร์เซ็นต์

6. ยีนโปรโมเตอร์ ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene)

6.1 ยีนโปรโมเตอร์ (promoter gene)

โปรโมเตอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในพืชที่ใช้กันมาก คือ โปรโมเตอร์จากยีน nospaline synthase (nos promoter) ซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti และโปรโมเตอร์จากไวรัสของกระหล่ำ cauliflower mosaic virus (CaMV 35S promoter) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพและแสดงออกได้ในเซลล์พืชทุกประเภท จึงเป็นโปรโมเตอร์ที่นิยมนำมาใช้กันมากในการถ่ายยีนในพืช เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน หรือโปรโมเตอร์ที่มาจากพืชที่ต้องการทดสอบ เช่น Sairam *et al.* (2003) ใช้พลาสมิด pMP90RK ที่บรรจุยีน *gfp* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์จากยีนแอคตินของข้าว (rice actin promoter) เพื่อถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของข้าวโพดโดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าการแสดงออกของยีน *gfp* ได้ทั้งใบ เกสรตัวผู้ (anther) และละอองเรณู (pollen)

6.2 ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene)

เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกที่นิยมใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ ยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin และยีน *neomycin phosphotransferase* II (*nptII*) เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นต้น

6.2.1 ยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*)

เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminogycoside ที่มีคุณสมบัติในการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน เนื่องจากสารปฏิชีวนะ hygromycin จะไปขัดขวางการจดจำตำแหน่งของ aminoacyl tRNA และ

การเข้าเกาะที่ตำแหน่ง A-site ของไรโบโซมของพืช ดังนั้นการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin จะให้ผลที่แน่นอน ซึ่งสามารถยังยั้บการเจริญของเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมดและไม่พบภาวะเผือก (albino) หรือได้ต้นถ่ายยีนที่เป็นหมัน (Hiei *et al.*, 1997) โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Potrykus and Spangenberg, 1995) เช่น รายงานของ Kondo *et al.* (2000) ใช้ความเข้มข้นของ hygromycin ที่ 10-40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการตัดเลือกเนื้อเยื่อกระเทียม (*Allium satiuum* L.) ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นในแต่ละครั้งของการเปลี่ยนอาหาร และ Aldemita and Hodges (1996) ในข้าว *japonica* และ *indica* ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าการเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration) ของต้นข้าวที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin พบการแสดงออกของยีน *gus* น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น Komari *et al.* (1996) พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ลงในอาหาร regeneration ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย GUS histochemical assay แล้ว พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* 85 เปอร์เซ็นต์

6.2.2 ยีน *neomycin phosphotransferase* II (*nptII*)

เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin neomycin geneticin และ paramomycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminogycoside ที่มีคุณสมบัติในการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้พืชไม่สามารถสร้างโปรตีนเพื่อนำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ได้จึงทำให้เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ตาย มีรายงานการนำสารปฏิชีวนะ kanamycin มาใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด เช่น การทดลองของกัญจนา (2549) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีนที่มียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกในแคลลัสของถั่วฮามาต้า แต่ในการทดลองของ Aoki *et al.* (2002) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกถั่ว *Lotus japonicus* แต่พบว่ายังไม่เพียงพอที่จะทำให้เนื้อเยื่อตายหมด จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้แตกต่างกันนั้น เป็นเพราะพืชที่ใช้มีความแตกต่างกัน อีกทั้งเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีนก็แตกต่างกัน ทำให้ความทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้นั้นแตกต่างกัน

6.3 ยีนรายงานผล (reporter gene)

เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารคัดเลือกอื่นๆ และสามารถใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเหล่านี้ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจสอบได้ง่าย ยีนรายงานผลที่นิยมใช้กันมาก คือ ยีน *β-glucuronidase* (*gus*) และยีน *green fluorescent protein* (*gfp*)

6.3.1 ยีน *β-glucuronidase* (*gus*)

เป็นยีนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ K12 ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *β*-glucuronidase ซึ่งสามารถ hydrolysis กับสารตั้งต้นที่ไม่มีสี คือ สาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) ได้เป็นสารที่มีสีน้ำเงินเข้มบนเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้เข้าไปและมีความคงทนสูงไม่ละลายในแอลกอฮอล์ (Jefferson *et al*., 1987) เรียกการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ว่า GUS histochemical assay แต่หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีนี้จะทำให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถนำเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ต่อได้

6.3.2 ยีน *green fluorescent protein* (*gfp*)

เป็นยีนรายงานผลซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในพืชที่ทำการถ่ายยีนแล้ว ยีน *gfp* ถูกค้นพบประมาณ 40 ปีมาแล้วในแมงกะพรุน *Aequorea victoria* ในปี 1994 Chalfie *et al.* (1994) ได้ทำการโคลน cDNA ของ *A. victoria* และประสบความสำเร็จในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gfp* หลังจากนั้น Ahlandsberg *et al.* (1999) ใช้ยีน *green fluorescent protein* (*gfp*) เป็นยีนรายงานผลเนื่องจากโปรตีนชนิดนี้สามารถเรืองแสงได้เองโดยไม่ต้องอาศัยสารตั้งต้น (substrate) หรือโคแฟกเตอร์ใด ๆ ซึ่งยีน *gfp* นั้นถูกนำมาดัดแปลงเพื่อใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมโดยนำยีน *gfp* มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของโปรตีนที่สนใจแล้วถ่ายเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (Tian *et al*., 1999) ภายในระยะเวลาไม่นานก็สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงหรือรูปแบบของโปรตีนชนิดนี้ภายในเซลล์ที่มีชีวิตในสภาพธรรมชาติ (Cutler *et al*., 2000)

ต่อมายีน *gfp* ถูกนำมาใช้กับพืชดัดแปลงพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนเป็นการลดเวลาในการผลิตพืชแปลงพันธุ์ Finer and Finer (2000) และ Stewart (2001) กล่าวว่า

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gfp* นี้สามารถตรวจสอบกับเนื้อเยื่อได้โดยตรง ติดตามได้แบบ Real-time คือ สามารถติดตามผลได้ตลอดในช่วงที่พืชนั้นมีการเจริญเติบโต มีความคงทนสูงถึงแม้ทำการ sub-culture หลายครั้ง (Tian *et al.*, 1999) สามารถถ่ายทอดรุ่นต่อไปได้ การตรวจสอบนั้นทำได้สะดวกไม่จำเป็นต้องใช้โคเฟคเตอร์หรือซับสเตรทช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการเรืองแสง (Cutler *et al.*, 2000) ซึ่งตรงข้ามกับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยยีน *β-glucuronidase* (*gus*) หรือ ยีน *firefly luciferase* (*luc*) หลังจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจะทำลายเนื้อเยื่อพืช จึงทำให้ไม่สามารถนำเนื้อเยื่อไปใช้ประโยชน์ต่อได้ Kamate *et al.* (2000) รายงานว่าการถ่ายยีน *green fluorescent protein* (*gfp*) เข้าสู่ *Medicago truncatula* โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ผลการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนใช้วิธีวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลของต้นพืชด้วยเทคนิค Southern blot พบจำนวนชุดของ T-DNA ในจีโนมของพืชเป็นจำนวนมาก และพบว่าโปรตีน GFP ไม่ทำให้เกิดพิษกับต้นพืช ซึ่งการแสดงออกของยีน *gfp* นี้จะไม่ปรากฏเมื่อเกิด cytotoxic effect ในเซลล์พืช ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *gfp* มีความจำเพาะกับเซลล์แต่ละเซลล์จะแสดงออกในระยะเวลาอันสั้นหลังการถ่ายยีนและการแบ่งเซลล์ และ Miki and McHugh (2004) รายงานว่ายีน *green fluorescent protein* (*mgfp*) เป็นยีนรายงานผลที่ใช้ในการตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนหลังจากการถ่ายยีนเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของโปรโมเตอร์ เพื่อใช้คัดเลือกและติดตามผลของการถ่ายยีนในพืช เป็นวิธีการตรวจสอบที่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช

จารุวรรณ (2546) ได้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* ในข้าวรุ่น R_1 จากการตรวจสอบข้าวรุ่น R_O โดยวิธีชีวโมเลกุล พบว่า มีแถบดีเอ็นเอของยีน *GFP* อยู่ในข้าว R_O จำนวน 4 สายต้น (Y_2, Y_3, Y_{11}, Y_{14}) เมื่อนำเมล็ดจากต้น R_O เหล่านี้มาเพาะโดยสุ่มจำนวน 10 เมล็ดต่อ 1 ต้น R_O มาเพาะในจานที่มีความชื้นพอเหมาะต่อการงอกของเมล็ด หลังจากเมล็ดงอก นำไปตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเรืองแสง พบว่า สามารถตรวจสอบการเรืองแสงในเมล็ดข้าวรุ่น R_1 ซึ่งแสดงออกที่บริเวณปลายรากเป็นส่วนใหญ่ เมล็ดข้าวทั้ง 10 เมล็ดในแต่ละต้น R_O นั้น ตรวจพบการเรืองแสงต่างกัน คือ R_O รหัส Y_{11} พบการเรืองแสง 40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ R_O รหัส Y_{14} พบการเรืองแสง 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ด R_O รหัส Y_2 และ Y_3 พบการเรืองแสง 10 เปอร์เซ็นต์

ฐารินี (2547) ได้สร้างเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมที่สามารถแสดงออกในพืช ซึ่งมียีนรายงานผล คือยีน *GFP* และขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ศึกษาสำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนีย เวกเตอร์ใหม่ที่เรียกว่า pBI:GFP สร้างขึ้นจากการรวมชิ้นส่วนของเวกเตอร์ pTHI และ pBI121 โดยตัดชิ้นส่วน CaMV35s:GFP:nos-ter จาก pTHI

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII กับ *Eco*RI แล้วเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBI121 ที่ปราศจาก CaMV35s:GUS:nos-ter ในบริเวณ T-DNA จากนั้นทำการคัดเลือกและยืนยันเวคเตอร์ที่ได้ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 หลังจากถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวกเตอร์ pBI121 หรือ pBI:GFP เข้าสู่ใบพิทูเนีย เป็นเวลา 2 เดือน ปรากฏว่ามีชิ้นใบประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสที่ได้นี้สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin

ข้อควรคำนึงในการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้นเวกเตอร์ที่ใช้ควรมีส่วนของ RB และ LB ของ T-DNA หรือมีส่วนที่เหมือนกับส่วนของดีเอ็นเอที่ใส่ไว้ใน Ti plasmid ของ *Agrobacterium* เพื่อให้เกิดการเข้าไปรวมกันระหว่างยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปและโครโมโซมของพืช เช่น ควรมีดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุลของ *E. coli* อยู่ด้วยเพื่อใช้เพิ่มปริมาณของพลาสมิด อีกทั้งโปรโมเตอร์ที่จะถ่ายเข้าไปจำเป็นต้องแสดงออกได้ในเซลล์พืชด้วย

7. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression detection) การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบถาวร (stable transformant)

7.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression detection)

เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในพืช มักใช้การตรวจสอบยีนรายงานผล (reporter gene) ซึ่งเป็นยีนที่สามารถติดตามได้ง่าย ทำให้ทราบว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปนั้นเข้าไปในเซลล์พืชหรือไม่ ยีนรายงานผลที่นิยมมากที่สุดคือ ยีน *gus*A ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase เมื่อ hydrolysis กับสารละลาย X-Gluc ทำให้ได้สารที่มีสีน้ำเงินเข้มบนเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและมีความคงทนสูงไม่ละลายในแอลกอฮอล์ ฉะนั้นถ้าสร้างพลาสมิดที่มียีนรายงานผลเกาะติดกับยีนอื่นที่ต้องการ เมื่อตรวจสอบยีนรายงานผลแล้วให้ผลเป็นบวก จะสามารถคาดหวังได้ว่ายีนที่ต้องการนั้นเข้าไปในเซลล์พืชด้วย อย่างไรก็ตามถ้าตรวจสอบยีนรายงานผลเร็วเกินไป ผลบวกที่ได้จะไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนเหล่านั้นเข้าไปเชื่อมต่อกับจีโนมของพืชได้อย่างถาวร แต่เป็นวิธีที่ชี้ว่ายีนได้เข้าไปในเซลล์พืชเท่านั้น

7.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบถาวร (stable transformant)

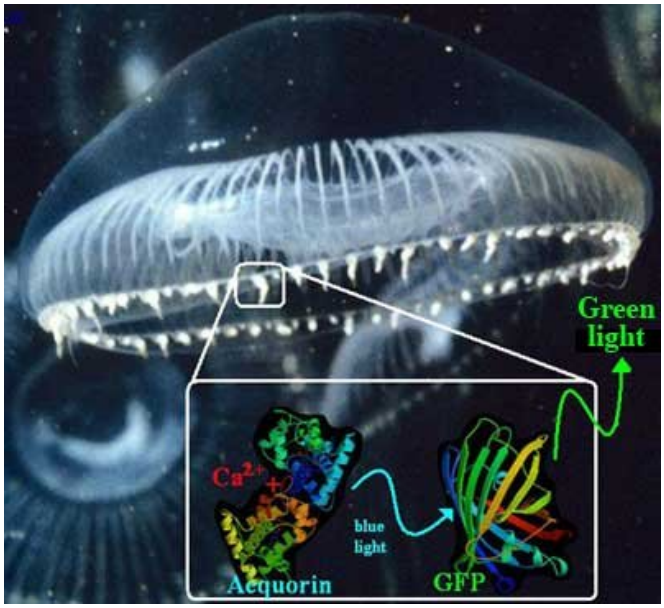
เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของพืชอย่างถาวร เป็นการตรวจสอบหลังจากการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารคัดเลือกสิ้นสุดแล้ว การตรวจสอบสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

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

7.2.2. การตรวจสอบโดยเทคนิค Southern hybridization เป็นการตรวจสอบการเข้าเชื่อมต่อของยีนเข้ากับจีโนมของพืช โดยอาศัยหลักของดีเอ็นเอที่สามารถจับคู่กันได้ (complementary) ระหว่าง ดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบ (probe) และเป็นวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยจำนวนและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (อุไรวรรณ, 2545)

8. กรีนฟลูออเรสเซนโปรตีน

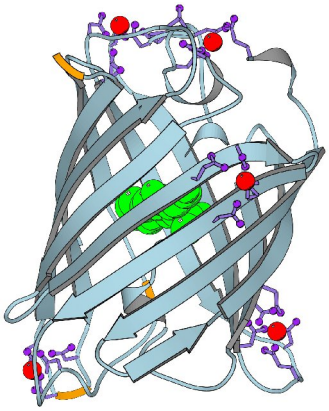
Aequorea victoria เป็นแมงกะพรุนชนิดหนึ่งที่สามารถเรืองแสงได้ที่บริเวณขอบของโครงสร้างคล้ายร่ม โดยแสงที่เรืองออกมามีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ที่เรืองแสงได้ (photogenic cells) จำนวน 6,000-7,000 เซลล์ ซึ่งในไซโตพลาสซึมของเซลล์เหล่านี้มีเม็ดแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากอัดกันอยู่หนาแน่น แกรนูลนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกันในการเรืองแสง คือ อีควอริน (aequorin) ที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยแคลเซียมไอออนแล้วปลดปล่อยแสงสีน้ำเงินความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และกรีนฟลูออเรสเซนต์โปรตีนหรือจีเอฟพี ที่ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสงสีน้ำเงินแล้วปลดปล่อยพลังงานแสงสีเขียวความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร ออกมา (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แมงกะพรุน *Aequorea victoria* (Shimomura, 2007)

8.1 โครงสร้าง 3 มิติของกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีน

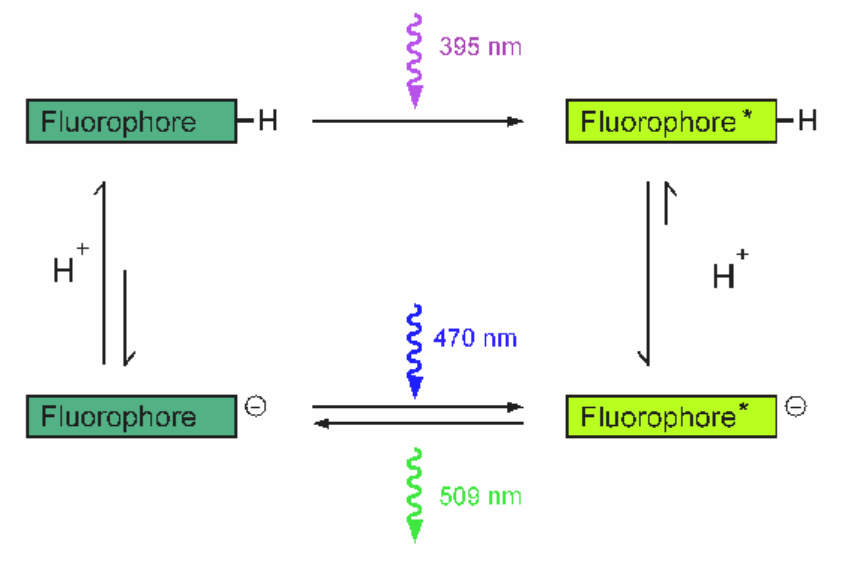
โครงสร้างของกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีนมีลักษณะที่แปลกไปจากโปรตีนชนิดอื่น Ellis *et al.* (2006) ได้ศึกษาโครงสร้างของกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีนและตั้งชื่อโครงสร้างชนิดนี้ว่า beta-can (ภาพที่ 3) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 โมเลกุลเรียงต่อกันเป็นสาย โดยด้านนอกของโครงสร้างเกิดจากสาย beta ทั้ง 11 สายขดขนานและอัดตัวกันแน่นทำให้เกิดเป็นรูปร่างทรงกระบอก ส่วนบริเวณภายในมีสาย alpha-helix พันอยู่โดยรอบ โดยที่กลางสายของ alpha-helix มีการเกิดพันธะกันระหว่างกรดอะมิโนลำดับที่ 65-67 เกิดเป็นวงแหวนขึ้นเรียกว่า โครโมฟอร์ ซึ่งทำหน้าที่ในการเรืองแสง โดยโครงสร้างทรงกระบอกนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 อังสตรอม และสูงประมาณ 40 อังสตรอม



ภาพที่ 3 โครงสร้าง 3 มิติของกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีน (Ellis *et al.*, 2006)

8.2 คุณสมบัติของกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีน

ในเซลล์ที่สามารถเรืองแสงได้ในแมงกะพรุน *A. victoria* นี้มีโปรตีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกันอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า ลูมิโซม จากที่กล่าวมาข้างต้นสามารถอธิบายกลไกในการเรืองแสงของลูมิโซมได้ โดยอีควอรีนที่อยู่ในรูปที่ไม่ว่องไว (inactive aequorin) จะถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมไอออนทำให้อยู่ในรูปที่ว่องไว (active) และมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ซึ่งทำให้โครโมฟอร์อยู่ในสถานะกระตุ้น (excited chromophore) ที่ต้องปลดปล่อยพลังงานสูงออกมาเป็นแสงสีน้ำเงิน จากนั้นกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีนจะดูดซับพลังงานเหล่านี้แล้วปลดปล่อยพลังงานต่ำกว่าออกมาเป็นแสงสีเขียว เมื่อกรีนฟลูออเรสเซนโปรตีนรับพลังงานแสงสีน้ำเงิน โครโมฟอร์ที่อยู่ในรูปฟีโนเลท (ล่างซ้าย) จะเข้าสู่สถานะกระตุ้น (ล่างขวา) แล้วปล่อยพลังงานแสงสีเขียวออกมา แต่ทั้งนี้ถ้าโครโมฟอร์ (ล่างซ้าย) ได้รับโปรตอนมันจะเปลี่ยนเป็นรูปไฮดรอกซีแทน ซึ่งเมื่อได้รับพลังงานแสงสีม่วงก็จะเข้าสู่สถานะกระตุ้น (บนขวา) ที่มีความไม่เสถียรจึงต้องปลดปล่อยโปรตอนออกมาทำให้กลับมาอยู่ในรูปฟีโนเลทสถานะกระตุ้นตามเดิม (ล่างขวา) ซึ่งจะปล่อยพลังงานแสงสีเขียวออกมาได้เช่นกัน เรียกวัฏจักรนี้ว่า วัฏจักรฟอสเตอร์ ตามชื่อนักวิทยาศาสตร์ที่ค้นพบ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 วัฏจักรฟอสเตอร์ (Jonda' s, 1996)

สำหรับการเรืองแสงของพืชนั้นเนื่องจากแสงมีลักษณะเป็นคลื่นและมีพลังงาน ซึ่งในพืชประกอบด้วยคลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ ที่สามารถดูดซับแสงได้ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ได้รับแสงจะเกิดพลังงานเร่งเร้า (excitation stage) ทำให้เกิดการส่งถ่ายอิเล็กตรอนไปยังส่วนต่างๆ ในกระบวนการส่งถ่ายอิเล็กตรอนเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ถ้าพลังงานเร่งเร้าเหล่านี้ไม่สามารถส่งถ่ายอิเล็กตรอนไปยังสารอื่นๆ ได้ พลังงานดังกล่าวเหล่านี้อาจสูญเสียในรูปของความร้อนหรือเปลี่ยนเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าเดิมหรือเกิดการเรืองแสงขึ้น (fluorescence) Quaedvlieg *et al.* (1998) กล่าวว่า wide-type GFP สามารถปลดปล่อยแสงได้ที่ความยาวคลื่นแสงน้ำเงิน (blue light) ในสภาพ excitation ที่ความยาวคลื่น 395-470 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานแสงสีเขียว (green light) ในสภาพ emission ที่ความยาวคลื่น 507 นาโนเมตร ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระบบการถ่ายยีนในพืช แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *gfp* ในพืชนั้นจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงลำดับ coding sequence เพื่อส่งเสริมการเรืองแสงในพืช เช่น ยีน *mgfp5* เป็นยีนที่แปลงมาจากยีน *gfp* ปกติไปเป็นยีน *gfp* ที่ผิดปกติ โดยการเปลี่ยนแปลงส่วนของ mRNA splice site ส่วนสั้นๆ บางส่วน เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานในพืช (Siemering *et al.*, 1996)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ในสภาพปลอดเชื้อ จำนวน 2 ชนิด คือ *Cryptocoryne affinis* และ *Cryptocoryne wendtii* 'Brown' ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท กรุงเทพอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์ จำกัด

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วย ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อพร้อมระบบไฟให้แสงสว่าง เครื่องเขย่า และเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว และตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

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

2.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ ได้แก่ เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator : Transsonic T460/H, 35 kHz, Elma Hans Schmidbauer, Germany) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เครื่องกวนตะกอน (Vortex®) และเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

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

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่

3.1.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

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

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายยีนได้แก่ acetosyringone (Fluka, Germany) และสารปฏิชีวนะ ได้แก่ cefotaxime (Claraxim® 1.0, Siam Bheasach Co., Ltd.) hygromycin B (Phytotechnology Laboratories) และ kanamycin (A.N.B. Laboratories Co., Ltd.)

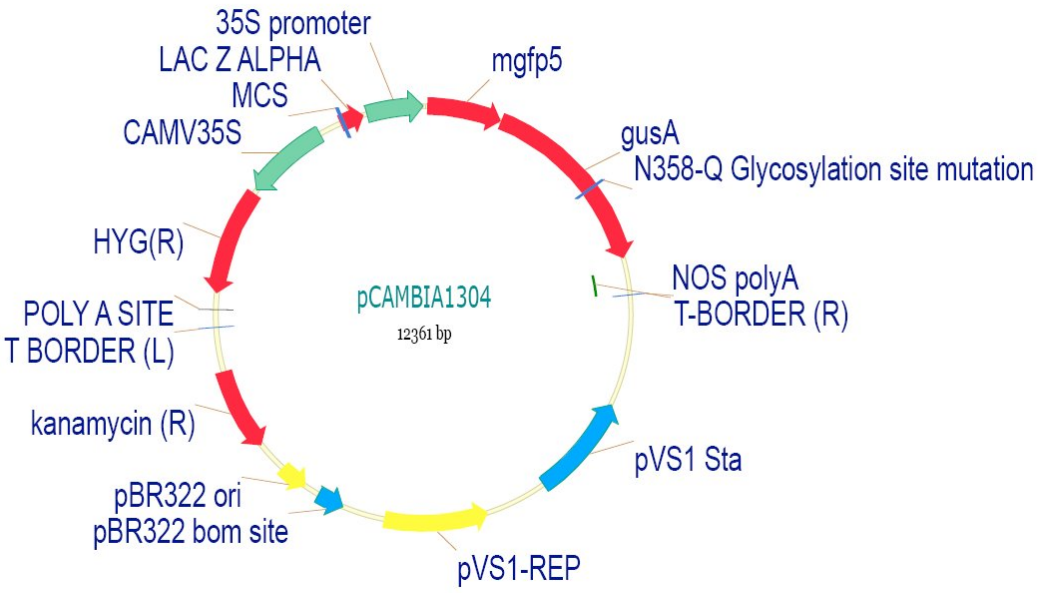
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ trypton, yeast extract, sodium chloride และวุ้นผง

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ได้แก่ QIAprep miniprep® spin column kit (บริษัท QIAGEN)

3.5 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) ได้แก่ disodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4), sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$), potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), potassium ferrocyanide ($K_4Fe(CN)_6$, ethylenediamine tetra acetic acid disodium salt dihydrate (Na_2EDTA), Triton X-100 และสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) (บริษัท Fermentas)

4. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ภายในบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 เป็น binary vecter ประกอบด้วยยีนรายงานผลยีน *green fluorescent protein* (*mgfp5*) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับยีน *β-glucuronidase* (*gus*) และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินสำหรับใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนทั้งสองส่วนนี้มีโปรโมเตอร์ CaMV35S เป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน และเทอร์มิเนเตอร์ คือ NOS เป็นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการหยุดการแสดงออกของยีน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แผนที่โครงสร้างและขนาดพลาสมิด pCAMBIA1304
ที่มา: CAMBIA, GPO Box3200, Canberra ACT 2601, Australia

5. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนรายงานผลและยีนคัดเลือก

5.1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนรายงานผล *β-glucuronidase* (*gus*) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส (ที่มา: รักชนก, 2549)

GUS456 (forward) : 5'-AAA CGG CAA GAA AAA GCA GTC-3'

GUS1375 (reverse) : 5'-CAG GCA CAG CAC ATC AAA GAG-3'

5.2 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนรายงานผล *green fluorescent protein* (*mgfp5*) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 456 คู่เบส มีที่มาจากลำดับเบสของยีนจากฐานข้อมูลจาก website http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/ ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Clustal W (http://www.ebi.ac.uk) และโปรแกรม fastPCR โดยมีลำดับเบสดังนี้

mgfp5-F 5'-CTG TTC CGT GGC CAA CAC TTG TCA CTA CTT TCA CTT ATG GTG TT-3'

mgfp5-R 5'-GCA GAT TGT GTG GAC AGG TA-3'

5.3 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส (ที่มา: รักชนก, 2549)

HPT-2F (forward) : 5'-CCT GAA CTC ACC GCG ACG-3'

HPT-2Rv (reverse) : 5'-AAG ACC AAT GCG GAG CAT ATA-3'

วิธีการ

1. การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoots) จากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne*

นำเนื้อเยื่อต้นอ่อนพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิด ตัดเฉพาะเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดขนาด 0.5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่เติมและไม่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน และย้ายเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นผง 7 กรัมต่อลิตร pH 5.7-5.8 เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD โดย

แต่ละทรีทเมนต์มี 5 ซ้ำๆ ละ 2 ชิ้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยนับจำนวนยอดและบันทึกลักษณะยอดที่เกิดขึ้น นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดยอดหลังจากการถ่ายยีน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และสารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens*

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมด และเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ โดยตัดเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิด มาจุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นซับเนื้อเยื่อให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7-5.8 และวุ้นผง 7 กรัมต่อลิตร และเติม BA (ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1) ร่วมกับเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 5 ซ้ำๆ ละ 2 ชิ้น บันทึกจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่พบเชื้อ *A. tumefaciens* เจริญอยู่ และจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่ในแต่ละชิ้นเนื้อเยื่อ

2.2 การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่สามารถทำให้เนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายหมด โดยนำเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิด ตัดเฉพาะเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA (ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1) เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นผง 7 กรัมต่อลิตร

pH 5.7-5.8 และเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ระดับความเข้มข้น 0 5 10 15 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 2 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น บันทึกการตายของเนื้อเยื่อ เลือกระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เนื้อเยื่อพืชตายทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นระดับความเข้มข้นสำหรับการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป

3. การนำพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Agrobacterium tumefaciens*

3.1 การนำพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat shock

นำพลาสมิด pCAMBIA1304 ซึ่งมีขนาด 12,361 คู่เบสเข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (ภาคผนวก ข ที่ 3) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดนี้ โดยใช้วิธี heat shock transformation แล้วเพาะเลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะได้ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่มียีน *nptII* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN) (ภาคผนวก ข ที่ 1) และนำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบอีกครั้ง โดยนำพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีตำแหน่งการตัดอยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1304 เช่น เอนไซม์ *Hin*dIII *Xho*I หรือ *Pea*I เพื่อเป็นการยืนยันโคลนของ *E. coli* ที่ได้ว่ามีพลาสมิด pCAMBIA1304 ตามต้องการ

3.2 การนำพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าสู่ *A. tumefaciens* โดยใช้วิธี electroporation

เตรียม competent cell ของ *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ตามภาคผนวก ข ที่ 4 แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำพลาสมิด pCAMBIA1304 ปริมาณ 100 นาโนกรัม เติมลงใน

competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในหลอด electroporation cuvette ขนาดช่อง 0.2 เซนติเมตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วใส่ electroporation cuvette ลงในช่องสำหรับผ่านกระแสไฟฟ้าของเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad®) และปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad®) โดยใช้ค่าตัวแปรต่างๆ คือ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) 2.5 กิโลโวลต์ กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า (field strength) 12.5 กิโลโวลต์ต่อเซนติเมตร ค่าความจุไฟฟ้า (capacitance) 25 ไมโครฟารัด ค่าความต้านทาน (resistance) 600 โอห์ม และใช้ระยะเวลา 4.7 มิลลิวินาที จากนั้นจึงเติมอาหารเหลว SOB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด electroporation cuvette ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วดูดของเหลวทั้งหมดใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดเอาอาหาร SOB ทิ้งโดยให้เหลืออยู่ในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วกวนตะกอนเซลล์ให้กระจาย จากนั้นดูดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร SOB ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะได้ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 มาตรวจสอบพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ โดยใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ก่อนที่จะนำเซลล์นั้นไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

4. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

ในการทดลองนี้ทำการเปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ประกอบด้วย 4 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 สายพันธุ์ *A. tumefaciens* ประกอบด้วย สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ประกอบด้วยยีน *β-glucuronidase* (*gus*) และยีน *green fluorescent protein* (*mgfp*5) เป็นยีนรายงานผลและยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ปัจจัยที่ 2 วิธีการทำบาดแผล มี 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 การใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อพืชเพียงอย่างเดียว และ วิธีที่ 2 การใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการทำบาดแผลโดยวิธี sonication โดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator : Transsonic T460/H, 35 kHz, Elma Hans Schmidbauer, Germany) เป็นเวลา 5 วินาที

ปัจจัยที่ 3 ความเข้มข้นของสาร acetosyringone มี 2 ระดับ คือ ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่เติมลงในอาหารทั้งในช่วงของการเลี้ยงเชื้อ การปลูกเชื้อบนเนื้อเยื่อพืช (inoculation) และการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อ (co-cultivation)

ปัจจัยที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) มี 2 ระยะ คือ 1 และ 2 ชั่วโมง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 16 ทรีทเมนต์ โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 30 ชิ้น บันทึกเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินและให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินโดยให้คะแนนตามเกณฑ์ในภาพที่ 7 แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อคัดเลือกเป็นวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ต่อไป

4.1 ขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่ *Cryptocoryne* โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ มีขั้นตอนตามแผนผังในภาพที่ 6 โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

4.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำที่ใช้ในการถ่ายยีน

นำต้นอ่อน *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิด ที่มีอายุประมาณ 2 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตัดเฉพาะบริเวณปลายยอด จำนวนชนิดละ 480 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้มาทำบาดแผล ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 1 ปัจจัย คือ วิธีการทำบาดแผลเปรียบเทียบระหว่าง วิธีที่ 1 ใช้มีดผ่าครึ่งปลายยอดตามแนวยาวเพียงอย่างเดียว และวิธีที่ 2 การใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อพืชตามยาวร่วมกับการทำบาดแผลโดยวิธี sonication เป็นเวลา 5 วินาที โดยใช้เนื้อเยื่อจำนวน 240 ชิ้นต่อชนิดพืช แล้วนำเนื้อเยื่อที่ทำบาดแผลแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร

MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินโดยเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ก่อนการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเพื่อทำการ pre-culture เป็นเวลา 1 วัน

4.1.2 การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 คือ สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 โดยมียีน *β-glucuronidase* (*gus*) และยีน *green fluorescent protein* (*mgfp5*) เป็นยีนรายงานผล และมียีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) ซึ่งควบคุมลักษณะที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ใช้เป็นสารที่ใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนทั้ง 3 ชนิดนี้มีโปรโมเตอร์ CaMV35S เป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและเทอร์มิเนเทอร์ คือ NOS เป็นดีเอ็นเอส่วนควบคุมการหยุดการแสดงออกของยีน

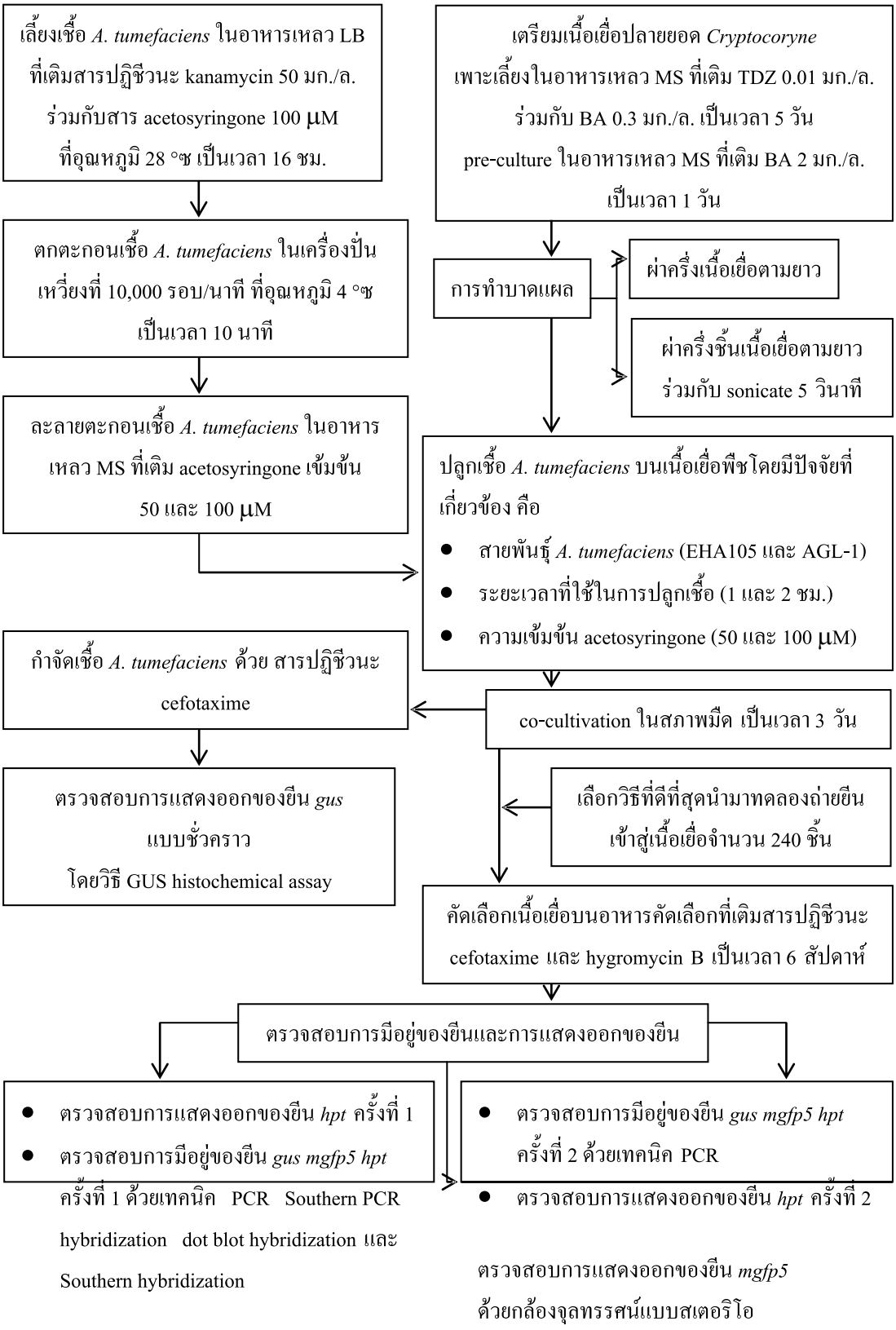
ปัจจัยที่ 2 คือ การเติมสาร acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ในอาหารสำหรับการปลูกเชื้อ (inoculation)

ขั้นตอนนี้มีวิธีการคือ เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกเชื้อ *A. tumefaciens* ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในสภาพมืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosyngone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาละลายในอาหารเหลวโดยปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 1 โดยใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7-5.8

ร่วมกับการเติมสาร acetosyngone ความเข้มข้น 50 หรือ 100 ไมโครโมลาร์ ตามทรีตเมนต์ที่กำหนด เปรียบเทียบระหว่างระดับความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

4.1.3 การถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นเนื้อเยื่อของ *Cryptocoryne*

นำเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* ที่ได้จากการทดลองที่ 4.1.1 มาเลี้ยงร่วมกับสารแขวนลอยของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.1.2 นำขวดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในสภาพมืด ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาแล้วนำเนื้อเยื่อมาซับสารแขวนลอยเชื้อส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินระดับความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 1 เพื่อเป็นการ co-cultivation โดยในขั้นตอนนี้ได้ทดสอบปัจจัยที่ 2 คือ การเติมสาร acetosyringone ในอาหารสำหรับ co-cultivation เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ แล้ว co-cultivation ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อพืชมากำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกโดยการล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS นานครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยการล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxamine ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transcient expression) ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987) เพื่อคัดเลือกวิธีการที่ดีที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Cryptocoryne* ในแต่ละชนิดโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะต่อไป

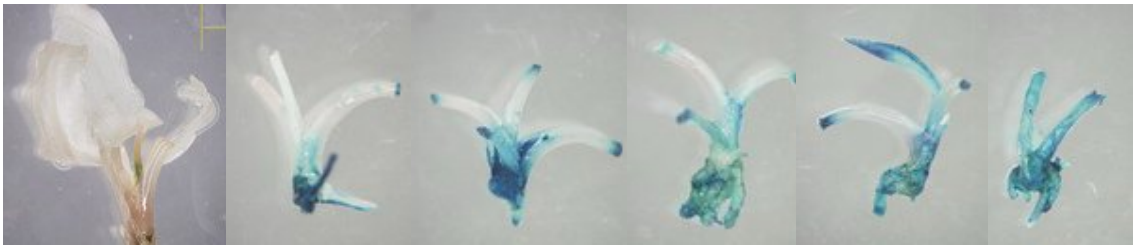


ภาพที่ 6 แผนผังขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

5. การตรวจสอบการแสดงออกและการมีอยู่ของยีน

5.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987)

นำชิ้นเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* ที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว จากข้อ 4.1.3 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อทั้ง 16 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 30 ชิ้น มาแช่ในสารละลาย X-Gluc solution mixed ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ GUS (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นเนื้อเยื่อมาตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ บันทึกจำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินและให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินตามเกณฑ์ในภาพที่ 7 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)



0 คะแนน 1 คะแนน 3 คะแนน 5 คะแนน 7 คะแนน 9 คะแนน

ภาพที่ 7 เกณฑ์การให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ตรวจสอบโดยวิธี GUS histochemical assay

0 คะแนน ไม่เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืช

1 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 1-29 เปอร์เซ็นต์

3 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 30-49 เปอร์เซ็นต์

5 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 50-69 เปอร์เซ็นต์

7 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 70-89 เปอร์เซ็นต์

9 คะแนน เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ 90-100 เปอร์เซ็นต์

5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก

นำเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* ที่ผ่านขั้นตอนการถ่ายยีนแล้วไปกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxamine ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกแบบ two layer ซึ่งประกอบด้วยอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินโดยเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเททับผิวหน้าด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกันปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยในอาหารทั้ง 2 ส่วนเติมสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ cefotaxamine และสารปฏิชีวนะ hygromycin B (เลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ) คัดเลือกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุกสัปดาห์ เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกนี้เป็นเนื้อเยื่อที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน (putative transformed tissue)

5.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

หลังจากชักนำให้พรรณไม้น้ำที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ hygromycin B เจริญเป็นยอดใหม่แล้ว นำยอดมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยมีวิธีการดังนี้

5.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช

สกัด genomic DNA จากใบของ *Cryptocoryne* ต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก (Doyle and Doyle, 1990) โดยนำใบของ *Cryptocoryne* ประมาณ 2-3 ใบ ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว เติมสารละลาย extraction buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 5) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex® และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 60 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที และนำมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารผสม chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที อีกครั้ง แล้ว

นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรน้ำส่วนใสที่ได้ จากนั้นเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรน้ำส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บดีเอ็นเอไว้ จากนั้นเติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนดีเอ็นเออยู่ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาผึ่งให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่มีเอนไซม์ Rnase/DNAse-free (US Biological, USA) 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นมำมาตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA marker) บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที ใน 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 10) และย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจดูขนาดและความเข้มของแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต่อไป

5.3.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* คือ GUS456 (forward) และ GUS1375 (reverse) ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 919 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mgfp5* คือ mgfp5-F และ mgfp5-R ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 456 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* คือ HPT-2F (forward) และ HPT-2Rv (reverse) ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 คู่เบส ซึ่งการตรวจสอบโดยวิธี PCR ของยีนทั้ง 3 ยีนนี้ใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาในภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 6 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำส่วนผสมปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในเครื่อง Thermocycler (Biometra®) ใช้อุณหภูมิ และเวลาตามตารางผนวกที่ 6.4 เมื่อครบเวลานำผลของปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยอิเล็กโตรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas) บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที ใน 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 10) และย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจดูขนาดของดีเอ็นเอ และบันทึกภาพ

5.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

5.4.1 การเตรียมแผ่นไนลอนเมมเบรนสำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในจีโนมของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

ภายหลังจากการตรวจสอบผลการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย UV-transilluminator แล้วจึงทำการย้ายดีเอ็นเอนี้ไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N^+ บริษัท Amersham) ซึ่งมีขั้นตอน คือ ล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย depurination (250 mM HCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH และ 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง แล้วจึงล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงเติมสารละลาย nutralization (0.5 M Tris-HCl; pH 7.5 และ 1.5 M NaCl) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกรอบ ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาอยู่บนไนลอนเมมเบรนโดยวางกระดาษ Whatman 3 MM ใช้เป็นสะพานในอ่างที่มีสารละลาย 10X SSC (0.3 M sodium citrate และ 3 M NaCl) นำเจลที่ได้จากขั้นตอนด้านบนมาแช่ในสารละลาย 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.5 M Na-citrate; pH 7.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลวางคว่ำหน้าลงบนกระดาษ Whatman 3 MM จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล วางทับด้วยกระดาษ 3MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลายๆ ชั้นให้มีความหนา 20 เซนติเมตร จากนั้นวางวัตถุที่มีน้ำหนัก 500 กรัม ทับบนกระดาษซับอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลขึ้นมาติดอยู่บนไนลอนเมมเบรน จากนั้นลอกไนลอนเมมเบรนออกจากเจลแล้วนำมาแช่ในสารละลาย 2X SSC นาน 5 นาที ผึ่งไนลอนเมมเบรน

ให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอนเมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยา hybridization ในขั้นตอนต่อไป

5.4.2 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สำหรับปฏิกิริยา hybridization ด้วยเทคนิค PCR Labeling

ใช้พลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้พลาสมิดปริมาณ 200 พิโคกรัม และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน *gus* *mgfp5* หรือ *hpt* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 0.125 ไมโครโมลาร์ และติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบด้วย PCR DIG Labeling kit (บริษัท Roche Applied Science) ใช้อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนแต่ละชนิด (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 7)

5.4.3 การทำปฏิกิริยา hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 5.4.1 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 8) โดยเติมสารละลาย hybridization ลงในหลอด hybridization ที่ใส่ไนลอนเมมเบรน ใช้ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ไนลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากข้อ 5.4.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งที่มีเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดดังกล่าว แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปเติมลงในหลอด hybridization ที่มีไนลอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

5.4.4 การตรวจสอบผลการ hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ผ่านการ hybridization แล้วจากข้อ 5.4.3 มาล้างด้วยสารละลาย low stringency buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 8) โดยเติมสารละลายให้ท่วม

ไนลอนเมมเบรน เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งและทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 8) โดยเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 8) ที่เติม Tween 20 ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ย้ายไนลอนเมมเบรนลงในถุงพลาสติก เติมสารละลาย blocking solution (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 8) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในถุงและปิดปากถุงให้สนิทนำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไนลอนเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphate ที่เจือจาง 1 : 10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างไนลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วปรับสภาพไนลอนเมมเบรนด้วยการแช่ไนลอนเมมเบรนลงในสารละลาย detection buffer (ภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ 8) นาน 3 นาที โดยไม่ต้องเขย่า ย้ายไนลอนเมมเบรนมาวางลงบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย detection buffer เข้ากับ chemiluminescent substrate (CDP star™) ในอัตราส่วน 1:500 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยลงบนไนลอนเมมเบรนให้ทั่ว วางไนลอนเมมเบรนไว้ในที่มืดนาน 15 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง นำไนลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์มโดยทำในห้องมืดนาน 10-60 นาที เมื่อครบกำหนดจึงล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

5.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค dot blot hybridization ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ การเตรียม DNA blot การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ของยีนทั้ง 3 ยีน การทำปฏิกิริยา hybridization และการตรวจสอบผลการ hybridization ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

5.5.1 การเตรียม DNA blot

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยอด *C. affinis* และ *C. wendtii* ‘Brown’ ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนตัวอย่างละ 2 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อจากนั้นนำมาหยดลงบนไนลอนเมมเบรน ผึ่งไนลอนเมมเบรน

ให้แห้ง ก่อนนำไนลอนเมมเบรนไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับไนลอนเมมเบรน

5.5.2 การทำปฏิกิริยา hybridization และการตรวจสอบผลการ hybridization

นำดีเอ็นเอตรวจสอบจากข้อ 5.4.2 มา pre- hybridization กับไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 5.5.1 โดยวิธีการเดียวกับข้อ 5.4.3 จากนั้นจึงตรวจสอบผลโดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 5.4.4

5.6 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนและจำนวนชุดของยีนด้วยเทคนิค Southern hybridization

5.6.1 สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากใบ *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและต้นปกติอายุ 3-5 เดือน โดยตัดใบของ *Cryptocoryne* ประมาณ 2-3 กรัม มาสกัดโดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990)

5.6.2 นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 5.6.1 จำนวน 20 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนเพื่อให้เกิดการตัดดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วไปทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นานประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

5.6.3 ย้ายดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบจากเจลอะกาโรสไปสู่ไนลอนเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสจากข้อ 5.6.2 มาทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 5.4.1

5.6.4 การทำปฏิกิริยา hybridization โดยนำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 5.6.3 มา pre- hybridization โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 5.4.3

5.6.5 การตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา hybridization โดยนำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 5.6.4 มาตรวจสอบโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 5.4.4

5.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5*

นำต้น *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนที่พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์แล้ว มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus รุ่น SZX12) ภายใต้แสงในสภาพ excitation ที่ 488 นาโนเมตร และแสงในสภาพ emission ที่ 510 นาโนเมตร บันทึกเปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่เกิดการเรืองแสงสีเขียวบนเนื้อเยื่อพืชที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

6. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

7. ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนมิถุนายน 2549 สิ้นสุดการทดลอง เดือนสิงหาคม 2551

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoots) จากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne*

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณยอดให้ได้จำนวนมากโดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดของ *Cryptocoryne* 2 ชนิด คือ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' บนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าเริ่มเกิดยอดใหม่ขนาดเล็กเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2-3 สัปดาห์ และพบว่าเกิดยอดได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 4 โดย *C. affinis* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 2 4 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ยเท่ากับ 4.2 3.7 3 และ 2.9 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเกิดยอดเพียง 1 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อเท่านั้น (ตารางที่ 1 และภาพที่ 8)

ส่วนการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงแรกเป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า *C. affinis* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 5 3 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 7.7 7.2 6.4 และ 6.1 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ และ BA นาน 5 วันแล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถเกิดยอดอ่อนได้ 2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเลยตลอดทุกช่วงการเจริญเติบโต (ตารางที่ 1 และภาพที่ 9)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของ *C. wendtii* 'Brown' พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ

4.1 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 1 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.8 3.8 3.2 และ 3 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อตามลำดับ ส่วนในอาหารที่ไม่เติม BA พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 1.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 8)

และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า *C. wendtii* 'Brown' ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาได้แก่ อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 5 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 5.7 5.5 5.4 และ 4.3 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ และ BA ในช่วง 5 วันแรกแล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA เกิดยอดใหม่ได้เพียง 2.2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อเท่านั้น (ตารางที่ 1 และภาพที่ 9)

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินนี้ เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยระหว่างการนำเนื้อเยื่อปลายยอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงแรกเป็นระยะเวลา 5 วัน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงโดยไม่ได้นำเนื้อเยื่อปลายยอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ดัดแปลงสูตรดังกล่าวก่อน แต่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตลอดช่วงการทดลอง พบว่าการใช้อาหารทั้ง 2 กลุ่มให้จำนวนยอดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในกรณีของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของ TDZ ที่แม้ว่าจะใช้ในปริมาณน้อยและช่วงสั้นๆ ก็ให้ผลดีกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Karsedis and Geneve (1997) ที่ได้นำชิ้นส่วนข้อของ Eastern redbud (*Cercis canadensis* L.) มาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร DKW ที่เติม BA ความเข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าชิ้นส่วนข้อของ Eastern redbud ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร DKW ที่เติม BA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอด 7.8-9.8 ยอดต่อชิ้น ซึ่งสูงกว่าอาหารที่มี BA เพียงอย่างเดียว ที่ชักนำให้เกิดยอดได้เพียง 5.8-7.2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อเท่านั้น

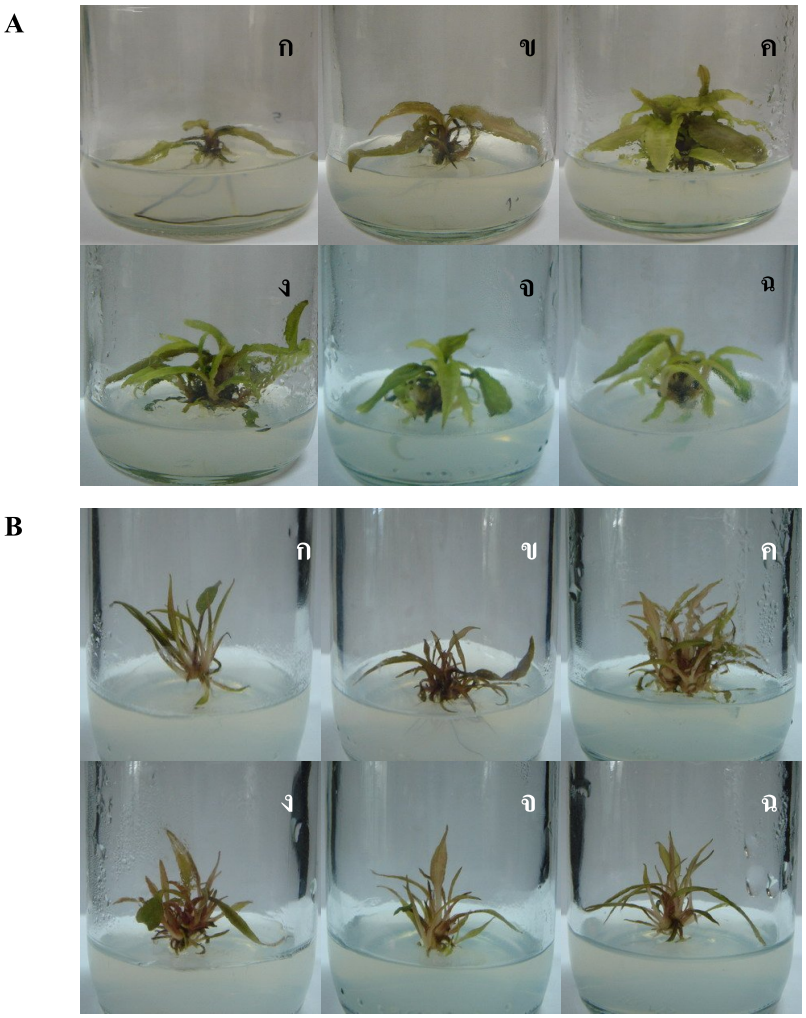
การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ซึ่งเป็นสารประเภทคล้ายไซโตไคนินในกลุ่มฟีนิลยูเรียนั้นแม้ว่าจะสามารถช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และให้ผลดีในการเพิ่มจำนวนยอด แต่มีรายงานว่าการใช้ TDZ เป็นระยะเวลานานยอดที่ได้ส่วนใหญ่มักมีลักษณะเป็นกลุ่มยอดขนาดเล็ก ยอดใหม่ที่ได้มีลักษณะสั้นเป็นกระจุก ใบแคบและสั้น ดังนั้นจึงมีผู้ทดลองใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาสั้น 1-5 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงในอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อช่วยให้ยอดใหม่ที่ได้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (พรพิมล และ ดวงจันทร์, 2549) ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองใน *Cryptocoryne* ในครั้งนี้เช่นกัน

จากการทดลองใน *Cryptocoryne* นี้พบว่า การนำเนื้อเยื่อปลายยอด *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระยะที่ 2 ด้วยอาหารที่เติม BA แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นในช่วงแรก แม้ว่าจะทำให้ได้ผลดีกว่าการไม่กระตุ้น แต่การใช้ไซโตไคนินเป็นระยะเวลานานและต่อเนื่องมีผลดีและมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของยอดด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นเนื้อเยื่อได้จากการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนของปลายยอดของพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยเติมและไม่เติม TDZ ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

ชนิดพรรณไม้น้ำ	ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต							ค่าเฉลี่ย	F-test[1/]
	ความเข้มข้นช่วงแรก	ความเข้มข้น BA (มก./ล.) ในช่วงที่ 2							
	TDZ (มก./ล.)+BA (มก./ล.)	0	1	2	3	4	5		
C. affinis	0 + 0	1.0	2.9	3.7	4.2	3.0	4.6	3.2 b	
	0.01 + 0.3	2.0	6.1	6.4	7.2	8.2	7.7	6.3 a	
	ค่าเฉลี่ย	1.5 c	4.5 ab	5.1 ab	5.7 ab	5.6 ab	6.2 a		*
	t-test							*	
C. wendtii 'Brown'	0 + 0	1.6	3.8	4.1	3.8	3.2	3	3.3 b	
	0.01 + 0.3	2.2	6.5	5.4	5.7	4.3	5.5	4.9 a	
	ค่าเฉลี่ย	1.9 c	5.2 a	4.8 ab	4.8 ab	3.8 ab	4.3 ab		*
	t-test							*	

[1/]* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบค่าโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 8 ลักษณะเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne affinis* (ภาพ A) และ *C. wendtii* 'Brown' (ภาพ B) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน

ก. อาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA

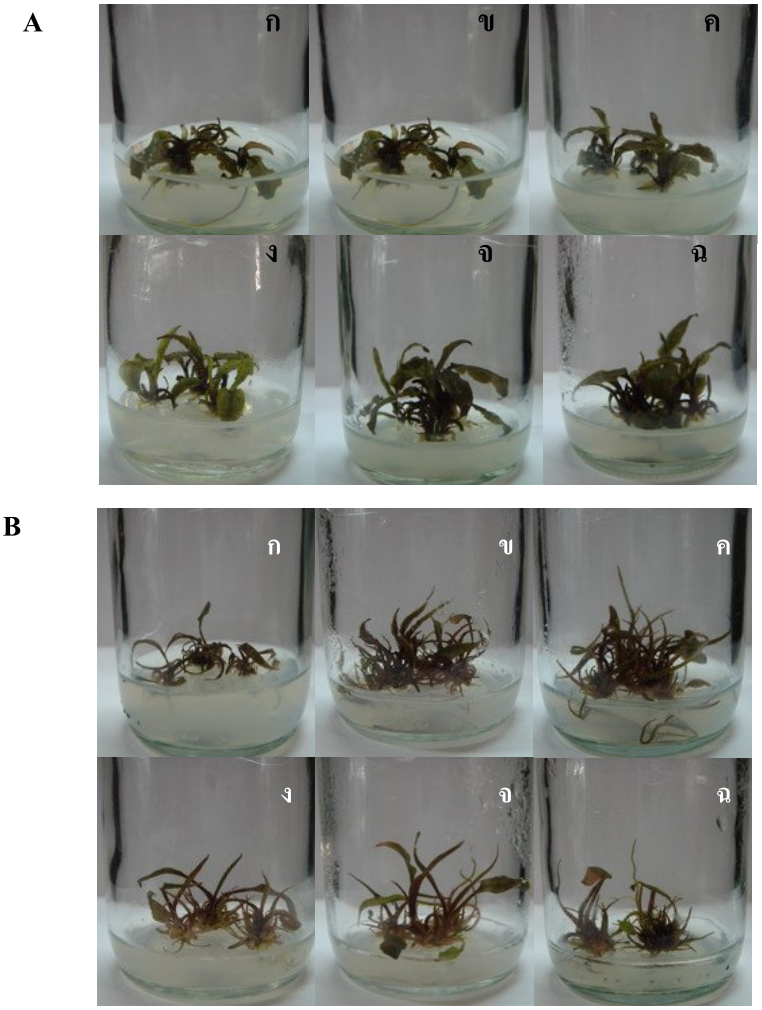
ข. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 9 ลักษณะ *Cryptocoryne affinis* (ภาพ A) และ *C. wendtii* 'Brown' (ภาพ B) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน

ก. อาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม BA

ข. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบผลของสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* ซึ่งมีการทดสอบสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* หลังจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ และสารปฏิชีวนะ hygromycin B ซึ่งใช้สำหรับการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการถ่ายยีนที่มียีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก (selectable marker gene) ซึ่งการทดสอบสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดให้ผลดังนี้

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens*

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

การเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของแคลลัสและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชได้ (Mathais and Boyd, 1986) ดังนั้นในการเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสมควรเลือกความเข้มข้นของสารในระดับที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมด และมีผลเชิงลบต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุด ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้

จากการทดลองนี้ได้นำเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* มาจุ่มในเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* ทั้งสายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 และนำเนื้อเยื่อ *C. affinis* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร

แข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ *C. wendtii* 'Brown' นั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหารเพาะเลี้ยงความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ พบว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้หมด 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อความสูงของยอด *Cryptocoryne* คือ ทำให้ยอดที่ได้มีขนาดสั้นลง (ภาพที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ฉัตรนภา (2545) ใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วเขียว พบว่าความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อการเกิดยอดโดยยอดที่ได้มีขนาดสั้นลง

นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในทุกระดับที่ทดสอบนั้นมีผลกระทบเชิงบวกต่อการเกิดยอดของเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยเนื้อเยื่อ *C. affinis* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้ 2.5-3.7 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วน *C. wendtii* 'Brown' นั้นเกิดยอดได้ 3.4 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในขณะที่อาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เกิดยอดได้เพียง 1 ยอดเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Caboni *et al.* (1999) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของสาลี่ป่าบนอาหารแข็ง LP พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ถึง 4.2 ยอดต่อชิ้น ในขณะที่อาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เกิดยอดได้เพียง 2.6 ยอดเท่านั้น และได้อธิบายว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime เป็นสารที่ช่วยเพิ่มความสามารถในพัฒนาทางด้านสัณฐานของพืช อีกทั้งสารปฏิชีวนะ cefotaxime ยังเป็นสารที่โครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน นอกจากนี้งานวิจัยของ Kane *et al.* (1990) ก็ยืนยันผลในทำนองเดียวกันคือ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *Cryptocoryne lucens* บนอาหารแข็งสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) ที่เติม BA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุด คือ 7 ยอดต่อชิ้น

จากผลการทดลองดังที่กล่าวแล้วจึงเลือกใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการล้างเนื้อเยื่อและกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังจากการถ่ายยีนก่อนนำเนื้อเยื่อไปตรวจการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว และใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime

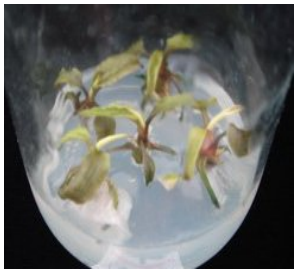
ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ทั้งสายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ร่วมกับการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานไม่ต่ำกว่า 1 เดือน

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* 2 ชนิดคือ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' และจำนวนยอดต่อชิ้นที่ได้จากเนื้อเยื่อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime เข้มข้น 0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

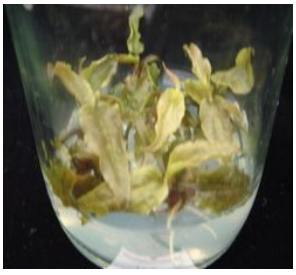
สายพันธุ์ *A. tumefaciens*	ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ cefotaxime (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้[1/]		จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้น[2/]	
		C. affinis	*C. wendtii* 'Brown'	*C. affinis*	*C. wendtii* 'Brown'
EHA105	0	0	0	1.0 c	1.0 c
	100	60	70	2.1 b	2.4 b
	200	80	90	2.6 b	3.2 ab
	300	90	100	3.7 a	3.4 a
	400	80	100	2.5 b	3.4 a
	500	100	100	2.5 b	3.4 a
F-test				*	*
AGL-1	0	0	0	1.0 c	1.0 c
	100	100	40	1.6 b	2.6 ab
	200	90	90	2.3 ab	2.4 b
	300	100	90	2.6 ab	3.2 ab
	400	100	100	3.3 a	2.8 ab
	500	100	100	2.3 ab	3.9 a
F-test				*	*

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

[2/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



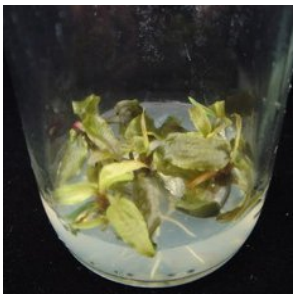
ไม่เติม cefotaxime



ความเข้มข้น 100 มก./ล.

ความเข้มข้น 200 มก./ล.

ความเข้มข้น 300 มก./ล.



ความเข้มข้น 400 มก./ล.

ความเข้มข้น 500 มก./ล.

ภาพที่ 10 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และต่อการเจริญของยอด *Cryptocoryne* เมื่อนำปลายยอดของ *C. affinis* จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เข้มข้น 0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

2.2 การทดสอบสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (hygromycin B) ที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชนั้นนอกจากมีการถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) และยีนที่สนใจเข้าสู่พืชแล้วมักจะมีการถ่ายยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก (selectable marker gene) ควบคู่ไปด้วย เพื่อช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การใช้ยีนคัดเลือกที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ช่วยให้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชประสบผลสำเร็จ โดยยีนเครื่องหมายที่แทรกเข้าไปรวมตัวอยู่ในจีโนมของพืชหลังจากการถ่ายยีนจะทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถแสดงลักษณะต้านทานต่อสารเคมีต่างๆ ที่จำเพาะกับยีนที่ใช้ในการคัดเลือก ทำให้เซลล์ดังกล่าวและสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นๆ จะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ (Komari *et al.*, 1996) ยีนคัดเลือกส่วนใหญ่มักเป็นยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (Miki and McHugh, 2004)

สารที่ใช้ในการคัดเลือกต้องสอดคล้องกับยีนคัดเลือกที่ใช้ และความเข้มข้นของสารคัดเลือกต้องเหมาะสมต่อชนิดและพันธุ์พืช เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่ำเกินไป จะทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ มีผลทำให้การคัดเลือกนั้นไม่ประสบผลสำเร็จ ทำให้ต้นที่ได้จากการคัดเลือกบางต้นเป็นต้นที่ไม่มียีนที่เข้าไปแทรกในจีโนม และในทางตรงกันข้ามการใช้สารคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินไป อาจทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นสามารถทนทานต่อสารคัดเลือกได้ในระดับความเข้มข้นหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตายอาจปล่อยสารชนิดอื่นที่เป็นพิษมายับยั้งการเจริญหรือไปขัดขวางการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ยังมีชีวิตอยู่ (Zhang *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดเพื่อใช้กำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถมีชีวิตรอดได้ ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตาย ซึ่งมักจะเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายทั้งหมด

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับเนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทดสอบความทนทานของเนื้อเยื่อปลายยอด *Cryptocoryne* ต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B เพื่อให้ทราบความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *hpt* ตายหมด

ภายใน 4 สัปดาห์ โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. wendtii* 'Brown' นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารทั้ง 2 สูตรนั้นเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ระดับความเข้มข้น 0 5 10 15 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์

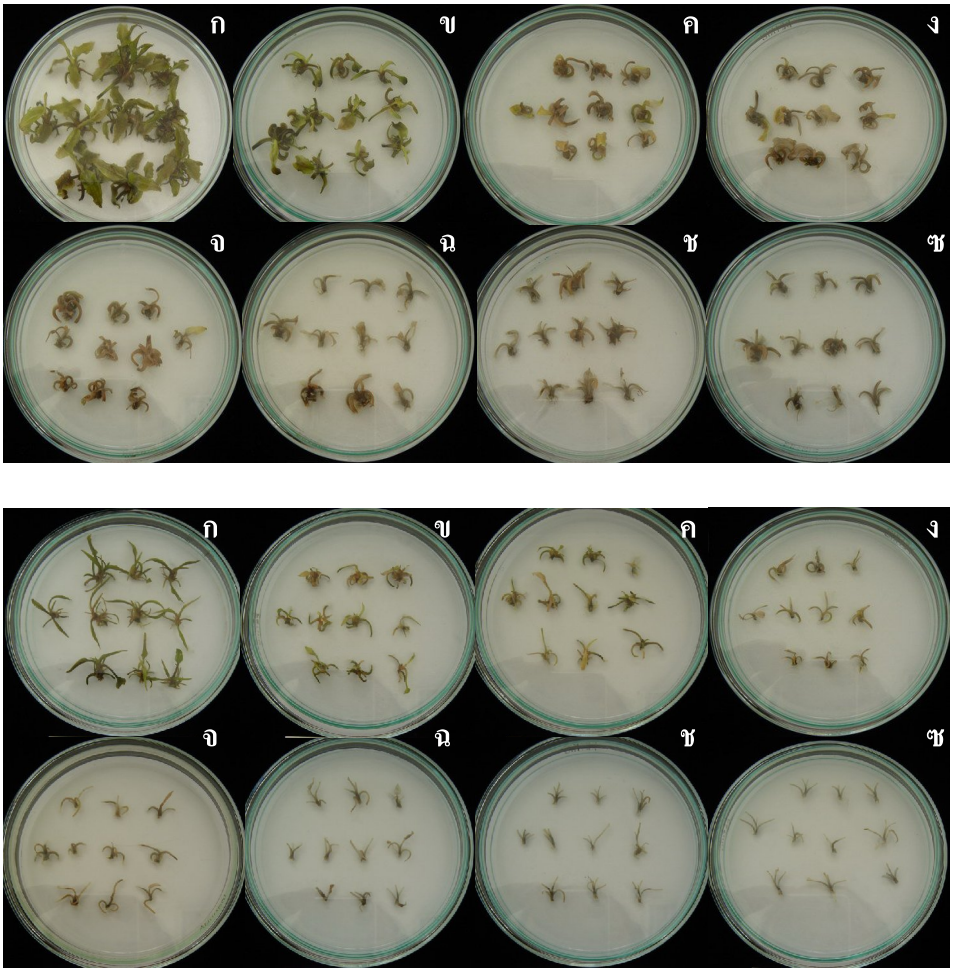
จากผลการทดลองพบว่า *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B เนื้อเยื่อยังคงเขียวสดและมียอดใหม่เกิดขึ้น (ภาพที่ 12) สำหรับเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 15 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป ในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง พบว่าเนื้อเยื่อไม่มีการเจริญเติบโต และจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองและตายภายใน 2-3 สัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 1-2 เนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียวและมีใบอ่อนเกิดขึ้นเล็กน้อย แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวจะค่อยๆ เป็นสีเหลืองซีดและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 11) ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ทำให้ *C. affinis* ตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 4 คือ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเนื้อเยื่อของ *C. wendtii* 'Brown' นั้นใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เนื้อเยื่อตายหมดภายใน 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 11)

แม้ว่าความเข้มข้นที่ทดสอบนี้จะเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งมีรายงานในพืชอื่นๆ เช่น Batra and Kumar (2003) รายงานว่าใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกการคัดเลือกเอมบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้า buffel ที่ได้รับการถ่ายยีน Al-Forkan *et al.* (2004) ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกแคลลัสของข้าว *indica* ที่ได้รับการถ่ายยีน และในการทดลองของ Atichart *et al.* (2007) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันเผือก (*Dendrobium secundum*) ที่ได้รับการถ่ายยีน เป็นต้น แต่ก็มีงานวิจัยในพืชหลายชนิดเช่นกันที่ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้นต่ำในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน เช่น Oosumi *et al.* (2006) ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อสตรอเบอร์รี่ที่ได้รับการถ่ายยีน และยังมีรายงานการใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ

แนวทางอื่นอีกโดยใช้หลายความเข้มข้นร่วมกัน เช่น Sujatha and Sailaja (2005) ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นเริ่มต้นในการคัดเลือกเนื้อเยื่อละหุ่งที่ได้รับการถ่ายยีนเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นเป็น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อสัปดาห์ที่ 2 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกเนื้อเยื่อสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้น

A

B



ภาพที่ 11 ผลของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ต่อเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne affinis* (ภาพ A) *C. wendtii* 'Brown' (ภาพ B) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

ก. 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ค. 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ง. 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จ. 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉ. 30 มิลลิกรัมต่อลิตร
ช. 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ. 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

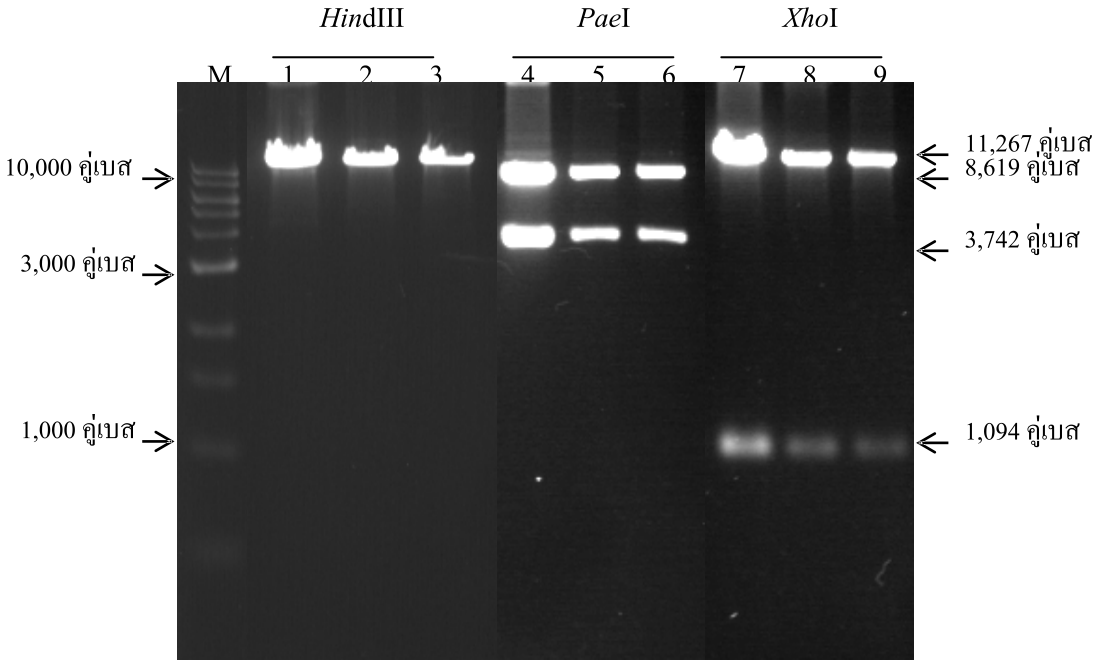
การทดลองที่ 3 การนำพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Agrobacterium tumefaciens*

การบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 ซึ่งมีขนาด 12,361 คู่เบสเข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยใช้วิธี heat shock transformation เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดนี้แล้วเพาะเลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะได้ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่มียีน *nptII* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (บริษัท QIAGEN) (ภาคผนวก ข ที่ 1) แล้วนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบอีกครั้ง โดยนำพลาสมิดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งการตัดอยู่ในพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่สกัดได้ เช่น เอนไซม์ *Hin*dIII *Xho*I หรือ *Pea*I แล้วแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าภายหลังจากการตัดพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ 1 ตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 12,361 คู่เบส เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pae*I พบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ 2 ตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 8,619 คู่เบส และ 3,742 คู่เบส และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I พบรูปแบบการตัดของเอนไซม์ 2 ตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 11,267 คู่เบส และ 1,094 คู่เบส (ภาพที่ 12) ซึ่งตรงตามตำแหน่งที่ควรจะเป็นของพลาสมิด pCAMBIA1304 จึงสามารถยืนยันได้ว่าพลาสมิด pCAMBIA1304 ได้ถูกถ่ายเข้าไปจริง

สำหรับการบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าสู่ competent cell ของ *A. tumefaciens* เพื่อใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* นั้น ทำโดยวิธี electroporation ด้วยเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad®) แล้วเพาะเลี้ยงและคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากผลการทดลองพบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ 1 และ 2โคโลนี ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อจากแต่ละโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และแยกสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (ภาคผนวก ข ที่ 1) แล้ว

ตรวจสอบด้วย 2 วิธี คือ การตรวจสอบด้วยวิธี digestion analysis ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Hin*dIII *Pae*I และ *Xho*I แล้วแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการตรวจสอบในพลาสมิดที่สกัดได้จากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

ส่วนการตรวจสอบวิธีที่สองคือ การตรวจสอบโดยวิธี PCR เพื่อตรวจหายีน *gus* *mgfp5* และยีน *hpt* พบว่าพลาสมิด CAMBIA1304 ที่สกัดได้จากเชื้อ *A. tumefaciens* ที่คัดเลือกไว้ถูกเพิ่มปริมาณให้ชิ้นดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR ของยีน *gus* ขนาด 919 คู่เบส ยีน *mgfp5* ขนาด 456 คู่เบส และยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 13) แสดงว่าในเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ทดสอบมีพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่มียีน *gus* *mgfp5* และยีน *hpt* อยู่ และสามารถใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เตรียมได้นี้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำในขั้นตอนต่อไป



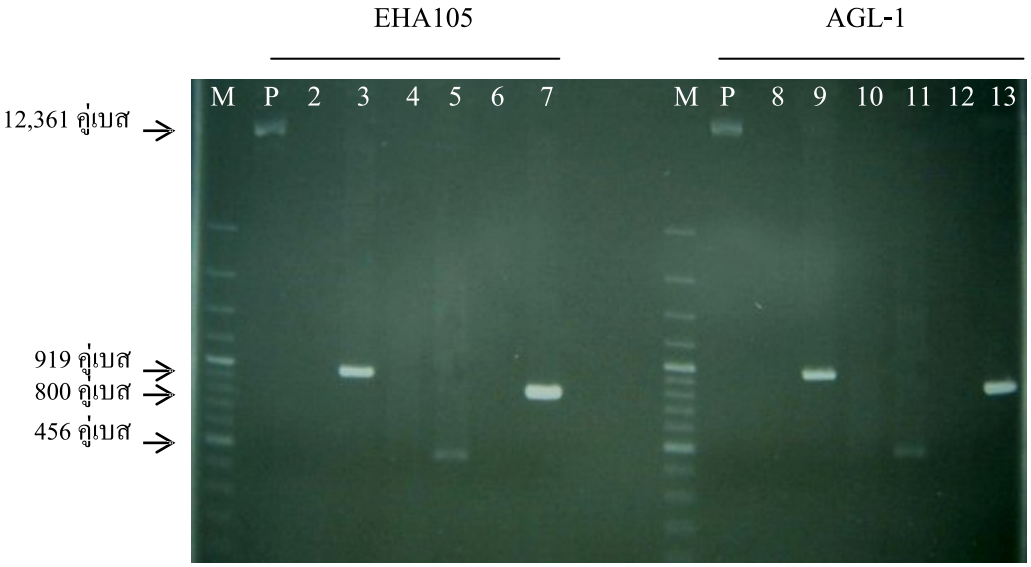
ภาพที่ 12 รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (lane 1-3) *Pea*I (lane 4-6) และ *Xho*I (lane 7-9) ของพลาสมิด pCAMBIA1304 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

lane M คือ 1 kb DNA ladder marker (บริษัท Fermentas)

lane 1 4 7 คือ พลาสมิด pCAMBIA1304 ที่สกัดจาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

lane 2 5 8 คือ พลาสมิด pCAMBIA1304 ที่สกัดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

lane 3 6 9 คือ พลาสมิด pCAMBIA1304 ที่สกัดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1



ภาพที่ 13 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และยีน *hpt* ใน *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 (lane 2-7) และ AGL-1 (lane 9-13) ภายหลังการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus mgfp5* และยีน *hpt*

lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus ladder (บริษัท Fermentas)

lane P คือ พลาสมิด pCAMBIA1304

lane 2 4 6 8 10 12 คือน้ำกลั่น (negative control)

lane 3 9 คือผลผลิต PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* ขนาดแถบดีเอ็นเอ 919 คู่เบส

lane 5 11 คือผลผลิต PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mgfp5* ขนาดแถบดีเอ็นเอ 456 คู่เบส

lane 7 13 คือผลผลิต PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* ขนาดแถบดีเอ็นเอ 800 คู่เบส

การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดของพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

4.1 การศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

การศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิด คือ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ซึ่งในเชื้อมีพลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นพลาสมิดแบบ binary vector ซึ่งมียีน *gus* และ *mgfp5* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยการทดลองครั้งนี้ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 4 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 สายพันธุ์ *A. tumefaciens* ปัจจัยที่ 2 วิธีการทำบาดแผล ปัจจัยที่ 3 ระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone และปัจจัยที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) ตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิธี GUS histochemical assay ทำหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) เป็นเวลา 3 วัน โดยนำเนื้อเยื่อดังกล่าวมากำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ติดมากับเนื้อเยื่อ โดยการล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตามด้วยการล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxamine ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวทันที ซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้

ปัจจัยที่ 1 สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens*

เนื่องจากพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งในสภาพธรรมชาติไม่เป็นพืชอาศัยของ *A. tumefaciens* (Potrykus, 1990a; Potrykus, 1990b) ดังนั้นการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้นจำเป็นต้องอาศัยสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมาก (hypervirulent strain) เช่น สายพันธุ์ EHA101 EHA105 AGL-0 และ AGL-1 เป็นต้น ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวได้ถูกพัฒนาส่วนของ Ti-plasmid ให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัยที่กว้างมากขึ้นและมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนที่สูงขึ้น (Lazo *et al.,* 1991; Hood *et al.,*1993) แต่มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จากการทดลองครั้งนี้ได้เปรียบเทียบ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ EHA105 และ AGL-1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Cryptocoryne* พบว่าสายพันธุ์

EHA105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ *C. affinis* สูงกว่าสายพันธุ์ AGL-1 โดยพบระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินเท่ากับ 5.55 และ 4.16 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yookongkaew *et al.* (2007) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวหอมมะลิ KDML 105 พบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1

สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำ *C. wendtii* 'Brown' โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 นั้นพบระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินใกล้เคียงกันคือ 5.42 และ 5.44 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 3) ซึ่งการทดลองของ Men *et al.* (2003) ที่ได้ใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ EHA105 และ AGL-1 ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุล *Den. Nobile* พบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ EHA105 เช่นกัน

จากการถ่ายยีนเข้าสู่ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* มีความเหมาะสมในการถ่ายยีนต่างกันในพืชต่างชนิดกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากยีน *vir* ใน *A. tumefaciens* แต่ละสายพันธุ์นั้นมีระดับความรุนแรงและความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของพืชต่างกัน ทำให้ความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชแตกต่างกันด้วย (Tzfira and Citovsky, 2006)

ปัจจัยที่ 2 วิธีการทำบาดแผลบนเนื้อเยื่อพืช

สำหรับการสร้างบาดแผลให้เนื้อเยื่อพืชเป้าหมายเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *A. tumefaciens* ประสบผลสำเร็จ เพราะนอกจากจะช่วยกระตุ้นให้พืชปล่อยสารประกอบฟีโนลิกออกมาเพื่อช่วยในกระบวนการส่งถ่ายยีนแล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้ยีนเป้าหมายสอดแทรกเข้าสู่จีโนมพืชได้ (Binns and Thomashow, 1988) แต่ถ้าบาดแผลที่เกิดขึ้นสร้างความเสียหายต่อเซลล์มากเกินไป อาจทำให้พืชสร้างสารประกอบฟีโนลิกออกมามากจนกระทั่งส่งผลไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ของพืช ทำให้พืชไม่สามารถฟื้นตัวใหม่ได้ จึงทำให้การถ่ายยีนไม่ประสบผลสำเร็จ

วิธีการสร้างบาดแผลขนาดเล็ก (micro-wounding) ให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยเทคนิคการใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) ซึ่งจะทำให้เกิดบาดแผลเป็นช่องเปิด

ขนาดเล็กจำนวนมาก ส่งผลให้ *A. tumefaciens* มีพื้นที่ในการ infect เนื้อเยื่อพืชได้มากขึ้นและเข้าสู่เซลล์พืชที่อยู่ชั้นในของเนื้อเยื่อได้ลึกกว่าการสร้างบาดแผลโดยการตัดเนื้อเยื่อ (Santarém *et al,* 1998) และการสร้างบาดแผลขนาดเล็กดังกล่าวยังมีผลดีในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ มีผลส่งเสริมการส่งถ่าย T-DNA จากเชื้อเข้าสู่จีโนมของพืชได้ (Amoah *et al.*, 2001) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการทำบาดแผลเพื่อการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* นี้เรียกว่าวิธี sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation (SAAT) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้เพื่อการถ่ายยีนในถั่วเหลืองเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการ sonicate ที่นานเกินไปจะมีผลต่อเซลล์พืช เพราะโดยปกติระยะเวลา sonicate ที่เหมาะสมนั้นสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผลขนาดเล็กๆ ยังสามารถเจริญเติบโตได้ หากใช้เวลานานเกินไปก็จะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์พืชที่รุนแรงจนอาจทำให้เซลล์พืชตายได้ (Trick and Finer, 1997 ; Finer and Finer, 2000)

สำหรับเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown'

ในการทดลองนี้การทำบาดแผลในบริเวณปลายยอดและตาข้างนั้นทำได้ยาก เนื่องจากยอดมีลักษณะสั้นเป็นกระจุก และในขั้นตอนการปลูกเชื้อนั้น *A. tumefaciens* เข้าไปสัมผัสบริเวณตาซึ่งอยู่ในส่วนของซอกใบได้ยากเช่นกัน ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาวิธีการทำบาดแผล 2 วิธี คือ การใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดตามยาวเพียงอย่างเดียว หรือการใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที โดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator : Transsonic T460/H, 35 kHz, Elma Hans Schmidbauer, Germany) จากการทดลอง พบว่า *C. affinis* เมื่อทำบาดแผลโดยการใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที มีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินเท่ากับ 4.94 คะแนน สูงกว่าการใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.77 คะแนน (ตารางที่ 3) และใน *C. wendtii* 'Brown' พบว่าให้ผลเช่นเดียวกันคือ การใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที มีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงกว่าการใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินเท่ากับ 5.88 และ 4.98 คะแนนตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การทำบาดแผลโดยวิธี sonicate ที่ใช้กับ *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิดนี้

ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Yookongkaew *et al.* (2007) ที่ได้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวหอมมะลิ KDML 105 โดยทดสอบการ sonicate ที่ระยะเวลา 0 5 10 และ 20 วินาที พบว่าเมื่อระยะเวลาในการ sonicate เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้นด้วย โดยการ sonicate

เป็นเวลา 20 วินาที พบพื้นที่การเกิดสีน้ำเงินสูงสุดเท่ากับ 42±23 เปอร์เซ็นต์ แต่ระยะเวลาดังกล่าวเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อตาย จึงแนะนำที่ระยะเวลา 10 วินาที ซึ่งแม้ว่าจะให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวต่ำกว่า คือมีพื้นที่ติดสีน้ำเงินเพียง 37 ± 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับการ sonicate นาน 20 วินาที

ปัจจัยที่ 3 ระดับความเข้มข้นของ acetosyringone

ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเกือบทุกชนิดมีรายงานว่าเมื่อเกิดบาดแผลมักจะไม่สามารถสร้างสารประกอบฟีโนลิกที่จำเป็นสำหรับกระตุ้นกระบวนการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เป็นพาหะได้ (Smith and Hood, 1995) ดังนั้นการเติมสาร acetosyringone ซึ่งเป็นสาร phenolic compound ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ *A. tumefaciens* และอาหารสำหรับการปลูกเชื้อ รวมทั้งในอาหารสำหรับการ co-cultivation นั้นสามารถกระตุ้นให้ยีน *vir* ในเซลล์ของ *A. tumefaciens* สามารถทำงานได้ดีขึ้น (Wordragen and Dons, 1992) ทำให้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวนั้นประสบผลสำเร็จ (Hiei *et al.*, 1997 ; Amoah *et al.*, 2001) โดยในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดมีรายงานการใช้สาร acetosyringone ความเข้มข้น 100-200 ไมโครโมลาร์ เติมลงในอาหารเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน

งานวิจัยนี้ได้ทดลองเติมสาร acetosyringone ลงในอาหารเหลว LB สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* และอาหารสูตร MS สำหรับการปลูกเชื้อและ co-cultivation เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Cryptocoryne* ทั้ง 2 ชนิด พบว่าการใช้สาร acetosyringone ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้มีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงกว่าที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Nandakumar *et al.* (2004) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone ที่เหมาะสมในการช่วยกระตุ้นการถ่ายยีนเข้าสู่ *Typha latifolia* ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 บรรจุพลาสมิด pCAMBIA1301 ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ซึ่งพบว่าการเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

ปัจจัยที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation)

ระยะเวลาในการปลูกเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการถ่ายยีน โดยการปลูกเชื้อเป็นขั้นตอนที่ช่วยทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* เข้ายึดเกาะกับบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชได้ (Batra and Kumar, 2003 ; Yong *et al.*, 2006) จากการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินใกล้เคียงกับการปลูกเชื้อ 1 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 4.86 และ 4.85 คะแนนตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 3) ส่วนการปลูกเชื้อบนเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. wendtii* 'Brown' พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ช่วยเพิ่มระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินให้สูงกว่าการปลูกเชื้อ 1 ชั่วโมง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ มีค่าเท่ากับ 5.96 คะแนน เมื่อปลูกเชื้อนาน 2 ชั่วโมง ในขณะที่การปลูกเชื้อ 1 ชั่วโมง มีค่าคะแนนการติดสีน้ำเงินเท่ากับ 4.90 คะแนน (ตารางที่ 3)

ผลของการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Wu *et al.* (2003) ที่ได้ทดลองปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ให้กับคัพภะอ่อนของข้าวสาลี เป็นเวลา 0 0.25 0.5 1 2 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เหมาะสมในการปลูกเชื้อมากที่สุด โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานขึ้น แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานเกินไปจะมีการรอดชีวิตลดลงและความสามารถในการเกิดต้นลดลง และในการทดลองของ Samiphak and Siwarungson (2006) ศึกษาระยะเวลาการปลูกเชื้อและการเลี้ยงร่วมกับเชื้อในแคลลัสของต้นอ่อนข้าวหอมดอกมะลิ 105 ได้แก่ ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ 10 นาที เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน และระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ 15 นาที เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน เมื่อตรวจสอบผลหลังจากการการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบการแสดงออกของยีน *gfp* ร้อยละ 10 และ 16 ตามลำดับ โดยปกติแล้วในพืชแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่เหมาะสมแตกต่างกันไป และยังขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนด้วย เช่น แคลลัสของอ้อยใช้เวลาในการปลูกเชื้อ 10 นาที (Arencibia *et al.*, 1998) เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดของข้าวโพดใช้เวลาในการปลูกเชื้อ 3 ชั่วโมง (Sairam *et al.*, 2003) ส่วนคัพภะอ่อนของข้าวโพดใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ 20 นาที (Danilova and Dolgikh, 2005) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในครั้งนี้เมื่อพิจารณาปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* พบว่าประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ *A. tumefaciens* วิธีการทำบาดแผล ระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone และระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) ซึ่งผลโดยสรุปพบว่า เมื่อนำเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' ที่ได้รับการถ่ายยีนไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว พบว่าทุกการทดลองมีเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นติดสีน้ำเงินเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อพิจารณาคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินในแต่ละชิ้นเนื้อเยื่อจากแต่ละปัจจัยที่ทดสอบแล้ว พบว่าประสิทธิภาพในการถ่ายยีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองนี้จึงเลือกวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ในการทดลองต่อไป โดยในกรณีของ *C. affinis* นั้น วิธีที่ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงที่สุด คือ การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และทำบาดแผลโดยวิธีการผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที ร่วมกับการเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในอาหารทั้งสำหรับการเลี้ยงเชื้อ การปลูกเชื้อและอาหารสำหรับ co-cultivation โดยปลูกเชื้อนาน 2 ชั่วโมงและ co-cultivation นาน 3 วัน ซึ่งพบระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุด คือ 8.13 คะแนน (ตารางที่ 4) ส่วน *C. wendtii* 'Brown'นั้น วิธีที่ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุดเช่นเดียวกับที่ใช้ใน *C. affinis* แต่เปลี่ยนเป็นใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 พบว่ามีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุด คือ 7.47 คะแนน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวของเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดของ *Cryptocoryne* ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นพาหะ

ปัจจัย	ระดับที่ศึกษา	ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน[2/]	
		C. affinis	*C. wendtii* 'Brown'
สายพันธุ์	EHA105	5.55 a	5.42 a
A. tumefaciens	AGL-1	4.16 b	5.44 a
วิธีทำบาดแผล[1/]	วิธีที่ 1	4.77 b	4.98 b
	วิธีที่ 2	4.94 a	5.88 a
ความเข้มข้น	50 ไมโครโมลาร์	3.93 b	5.06 b
acetosyringone	100 ไมโครโมลาร์	5.78 a	5.80 a
ระยะเวลา	1 ชม.	4.85 a	4.90 b
ที่ใช้ในการปลูกเชื้อ	2 ชม.	4.86 a	5.96 a

[1/] วิธีที่ 1 คือ การผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาว

วิธีที่ 2 คือ การผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที

[2/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) บนเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นพาหะ

สายพันธุ์ *A. tumefaciens*	วิธีทำบาดแผล[1/]	ความเข้มข้น acetosyringone (μM)	ระยะเวลาปลูกเชื้อ (ชม.)	เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นติดสีน้ำเงิน[2/]	ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน[3/]	
					C. affinis	*C. wendtii* 'Brown'
EHA105	วิธีที่ 1	50	1	100 (30/30)	4.27 def	3.20 g
			2	100 (30/30)	4.40 cde	4.13 ef
		100	1	100 (30/30)	5.60 bcd	4.80 def
			2	100 (30/30)	5.67 bc	5.87 abcde
	วิธีที่ 2	50	1	100 (30/30)	5.80 b	5.40 cdef
			2	100 (30/30)	4.40 def	6.60 abc
		100	1	100 (30/30)	6.20 b	6.33 abcd
			2	100 (30/30)	8.13 a	7.00 ab
AGL-1	วิธีที่ 1	50	1	100 (30/30)	2.60 g	5.00 cdef
			2	100 (30/30)	3.53 fg	6.40 abcd
		100	1	100 (30/30)	6.67 b	5.53 bcdef
			2	100 (30/30)	5.67 bc	4.20 ef
	วิธีที่ 2	50	1	100 (30/30)	3.33 ef	3.67 fg
			2	100 (30/30)	4.47 g	5.47 bcdef
		100	1	100 (30/30)	4.33 ef	4.67 ef
			2	100 (30/30)	3.39 ef	7.47 a
		F-test			*	*

[1/] วิธีที่ 1 คือ การผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาว

วิธีที่ 2 คือ การผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อตามยาวร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที

[2/] ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวนเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ต่อจำนวนเนื้อเยื่อที่นำมาทดลอง

[3/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 การทดสอบการถ่ายยีนโดยใช้วิธีที่เหมาะสม

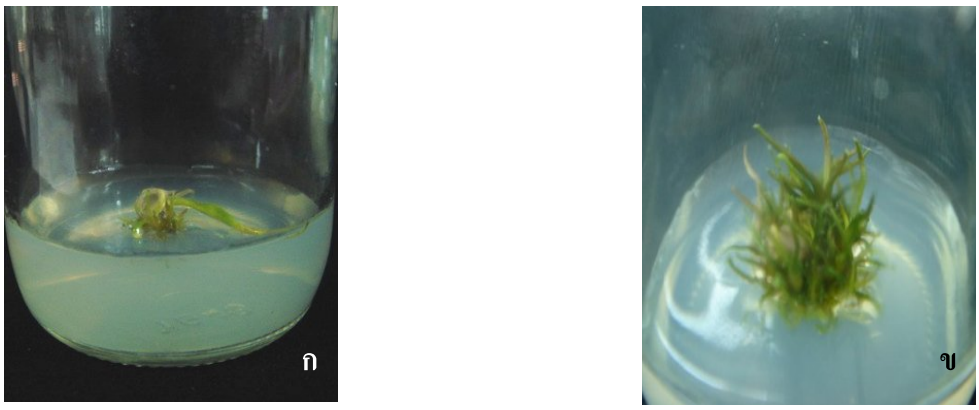
ภายหลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ตามวิธีที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.1 โดยใช้เนื้อเยื่อปลายยอดจำนวน 240 ชิ้นต่อชนิดพืช แล้วนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เพื่อให้ได้ยอดที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนอย่างถาวรแล้วนำมาตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิธีต่างๆ ให้ผลการทดลองดังนี้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *hpt*

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *hpt* ทำโดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown'ที่ผ่านการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ทำบาดแผลโดยวิธีการผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที โดยเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ อาหารสำหรับปลูกเชื้อและอาหารสำหรับ co-cultivation ใช้เวลาในการปลูกเชื้อนาน 2 ชั่วโมง และ co-cultivation เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อมากำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกโดยการล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS นานครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยการล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxamine ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการล้างแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน เพื่อกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วย้ายเนื้อเยื่อไปคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกแบบ two layers ซึ่งประกอบด้วยอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเททับผิวหน้าด้วยอาหารเหลวสูตรเดิมปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยในอาหารทั้ง 2 ส่วนเติมสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ cefotaxamine ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมทุกสัปดาห์ เพื่อใช้คัดเลือก *C. affinis* สำหรับ *C. wendtii* 'Brown' นั้นมีวิธีการคัดเลือกเช่นเดียวกันแต่ต่างกันที่อาหารคัดเลือก ประกอบด้วยอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxamine ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองพบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2-3 สัปดาห์ เนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มตาย ส่วนเนื้อเยื่อที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนยังคงมีชีวิตอยู่และพัฒนาเป็นยอดขนาดเล็ก

(ภาพที่ 14) และหลังจากการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชชนิดละ 240 ชิ้น เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า *C. affinis* มียอดที่พัฒนาขึ้นมาจำนวน 35 ยอด แต่ *C. wendtii* 'Brown' มีจำนวน 6 ยอดเท่านั้น จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อให้ยอดที่ได้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ยอดที่สามารถรอดชีวิตดังกล่าวนี้คาดว่าเป็นยอดที่พัฒนามาจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน *hpt* ซึ่งโดยปกติแล้วหากยีน *hpt* สามารถแสดงออกได้จะทำให้พืชที่มียีนนี้อยู่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin B ได้ (Hiei *et al.*, 1997)



ภาพที่ 14 การเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne wendtii* ‘Brown’ ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ hygromycin B ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ก) และยอดสามารถพัฒนาใหญ่ขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ข)

4.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการยืนยันผลตามข้อ 4.2 ทำโดยสกัดดีเอ็นเอจากใบ *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน และ *Cryptocoryne* ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

จากการตรวจสอบใน *C. affinis* จำนวน 35 ยอด พบการมีอยู่ของยีน *gus* ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส ในยอดหมายเลข 2 4 7 14 21 27 31 32 33 และ 35 รวมเป็น 10 ยอด คิดเป็น 28.57 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15ก และตารางที่ 5) พบการมีอยู่ของยีน *mgfp5* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 456 คู่เบส ในยอดหมายเลข 4 7 14 17 27 31 32 33 และ 35 รวมเป็น 9 ยอด คิดเป็น 25.71 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15ข และตารางที่ 5) และพบการมีอยู่ของยีน *hpt* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในยอดหมายเลข 7 14 17 20 27 31 32 33 และ 34 รวมเป็น 9 ยอด คิดเป็น 25.71 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15ค และตารางที่ 5) โดยจะพบยอดที่มีการคงอยู่ของยีน *gus* ยีนเดียวจำนวน 2 ยอด (ยอดหมายเลข 2 และ 21) ยอดที่มีการคงอยู่ของยีน *gus* และ *mgfp5* จำนวน 2 ยอด (ยอดหมายเลข 4 และ 35) ยอดที่มีการคงอยู่ของยีน *mgfp5* และ *hpt* จำนวน 1 ยอด (ยอดหมายเลข 17) ยอดที่มีการคงอยู่ของ *hpt* ยีนเดียวจำนวน 2 ยอด (ยอดหมายเลข 20 และ 34) และพบยอดที่มีการคงอยู่ของยีนครบทั้ง 3 ยีน จำนวน 6 ยอด (ยอดหมายเลข 7 14 27 31 32 และ 33)

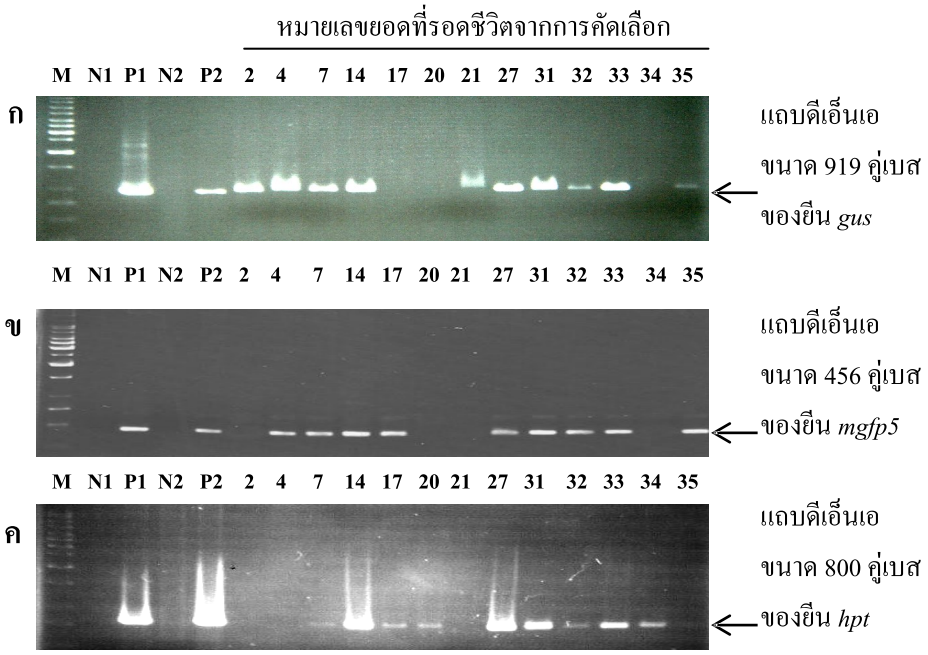
สำหรับ *C. wendtii* 'Brown' พบการมีอยู่ของยีน *gus* เพียงยีนเดียวในยอดหมายเลข 4 เท่านั้น จากยอดที่พัฒนาได้ทั้งหมด 6 ยอด คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16 ตารางที่ 5)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้งในยอดของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' มีบางยอดไม่พบทั้งยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* หรือบางยอดพบแต่ยีน *gus* และ *mgfp5* ส่วนบางยอดพบแต่ยีน *gus* หรือ *hpt* เพียงยีนเดียว อาจเนื่องจากการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้นในขั้นตอนการนำชิ้นส่วนของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชนั้นยังมีกลไกที่ไม่ทราบแน่นอน แต่มีรายงานว่าอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายยีนบริเวณ right border ของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชก่อน (Sheng and Citovsky, 1996) ซึ่งในพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่ใช้ในการทดลองนี้มียีน *gus* และ *mgfp5* เป็นยีนที่อยู่บริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งเป็นด้านที่ย้ายเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซม

ของเซลล์พืชก่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าส่วนของยีน *hpt* ที่อยู่ทางด้าน left border ของ T-DNA อาจเกิดการขาดหายไปบางส่วนในระหว่างขั้นตอนการถ่ายยีน นอกจากนี้การขาดหายไปของยีนหรือดีเอ็นเอบางส่วนยังอาจเกิดขึ้นได้ เมื่อดีเอ็นเอเหล่านี้ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชจะทำให้บางส่วนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ exonuclease ที่อยู่ภายในเซลล์ได้ง่าย ซึ่งเอนไซม์ exonuclease นี้จะทำหน้าที่ในการย่อยดีเอ็นเอในทิศทางปลาย 5′ ไปปลาย 3′ หรือ ในทิศทางปลาย 3′ ไปปลาย 5′ ได้ (Cooper, 2000) จึงอาจเป็นไปได้ว่าบางส่วนของยีน *hpt* ที่อยู่ทางด้านปลาย 5’ จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ exonuclease จัดได้ว่าเป็นการส่งถ่ายชิ้นส่วนของ T-DNA จาก *A. tumefaciens* ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าไปแทรกตัวในโครโมโซมของพืชได้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางส่วนของยีนที่อยู่บน T-DNA โดยกลไกของแบคทีเรียในขณะที่ส่งถ่ายชิ้น T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชหรือเมื่อแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์พืช

ในกรณีของยอดที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B แต่ไม่สามารถตรวจพบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในจีโนมของพืชซึ่งจำนวนยอดมากถึง 22 ยอด จากจำนวนยอดทั้งหมด 35 ยอด คิดเป็น 62.86 เปอร์เซ็นต์ ของต้นที่รอดชีวิตทั้งหมดนั้นอาจเนื่องมาจากในงานวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อส่วนยอดที่มีความหนาค่อนข้างมาก ทำให้อาจมีเนื้อเยื่อบางส่วนที่อยู่ด้านบนหรือด้านในไม่สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ดังนั้นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เคลื่อนย้ายเข้าไปในเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจเจือจางลง ทำให้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมด เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจึงอาจเจริญขึ้นมาเป็นยอดได้บนอาหารคัดเลือกหรือเจริญกลับขึ้นมาในภายหลังเมื่อนำออกมาจากอาหารคัดเลือกแล้วนอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการที่ยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ดังกล่าวมีลักษณะเป็น chimeras คือ ในยอดที่พัฒนาขึ้นใหม่มีเซลล์บางส่วนที่มียีนที่ถูกถ่ายเข้าไปปะปนอยู่กับเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้ยอดสามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือก แต่เนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบอาจเป็นส่วนที่ไม่มียีน

ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่า *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนทั้งหมด 13 ยอด ซึ่งยืนยันผลจากการให้ผลบวกของปฏิกิริยา PCR นั้นอาจมีการสอดแทรกของยีนในจีโนมของแต่ละเซลล์ในเนื้อเยื่อแตกต่างกัน เนื่องจากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้นคาดว่าเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจไม่ได้มีแหล่งกำเนิดมาจากเซลล์ๆ เดียวกันมีผลทำให้ไม่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ทุกเซลล์ได้ โดยยีนอาจเข้าไปในบางส่วนของต้นหรือบางเซลล์ และเซลล์นั้นอาจพัฒนาหรือไม่พัฒนาไปเป็นต้นก็ได้



ภาพที่ 15 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในยอด *Cryptocoryne affinis* ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นพาหะ ด้วยเทคนิค PCR

ก. การมีอยู่ของยีน *gus* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส

ข. การมีอยู่ของยีน *mgfp5* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 456 คู่เบส

ค. การมีอยู่ของยีน *hpt* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส

M = 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

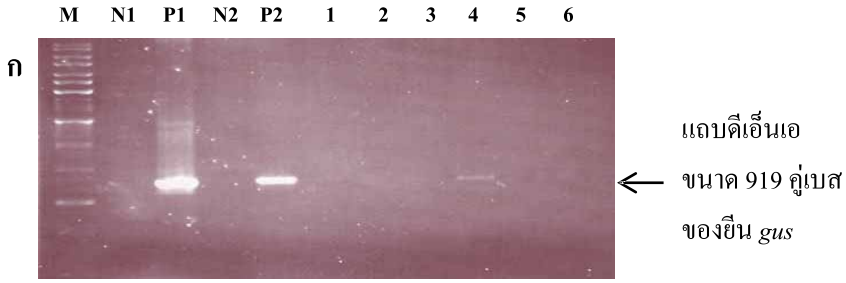
N1 = น้ำกลั่น (negative control)

P1 = ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2 = ดีเอ็นเอจาก *C. affinis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P2 = ดีเอ็นเอจากยาสูบที่มียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* (positive control)

2-35 = ดีเอ็นเอจากยอด *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 16 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในยอด *Cryptocoryne wendtii* 'Brown' ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นพาหะ ด้วยเทคนิค PCR โดยผลบวกจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส

M = 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

N1 = น้ำกลั่น (negative control)

P1 = ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2 = ดีเอ็นเอจาก *C. wendtii* 'Brown' ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

1-6 = ดีเอ็นเอจาก *C. wendtii* 'Brown' ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในจีโนมของ *Cryptocoryne affinis* จำนวน 35 ยอด และ *C. wendtii* 'Brown' จำนวน 6 ยอด โดยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt*

ไพรเมอร์	หมายเลขยอด *C. affinis* ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
ยีน *gus*	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ยีน *mgfp5*	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
ยีน *hpt*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

ไพรเมอร์	หมายเลขยอด *C. affinis* ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก																
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
ยีน *gus*	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
ยีน *mgfp5*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
ยีน *hpt*	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-

ไพรเมอร์	หมายเลขยอด *C. wendtii* 'Brown' ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก					
	1	2	3	4	5	6
ยีน *gus*	-	-	-	+	-	-
ยีน *mgfp5*	-	-	-	-	-	-
ยีน *hpt*	-	-	-	-	-	-

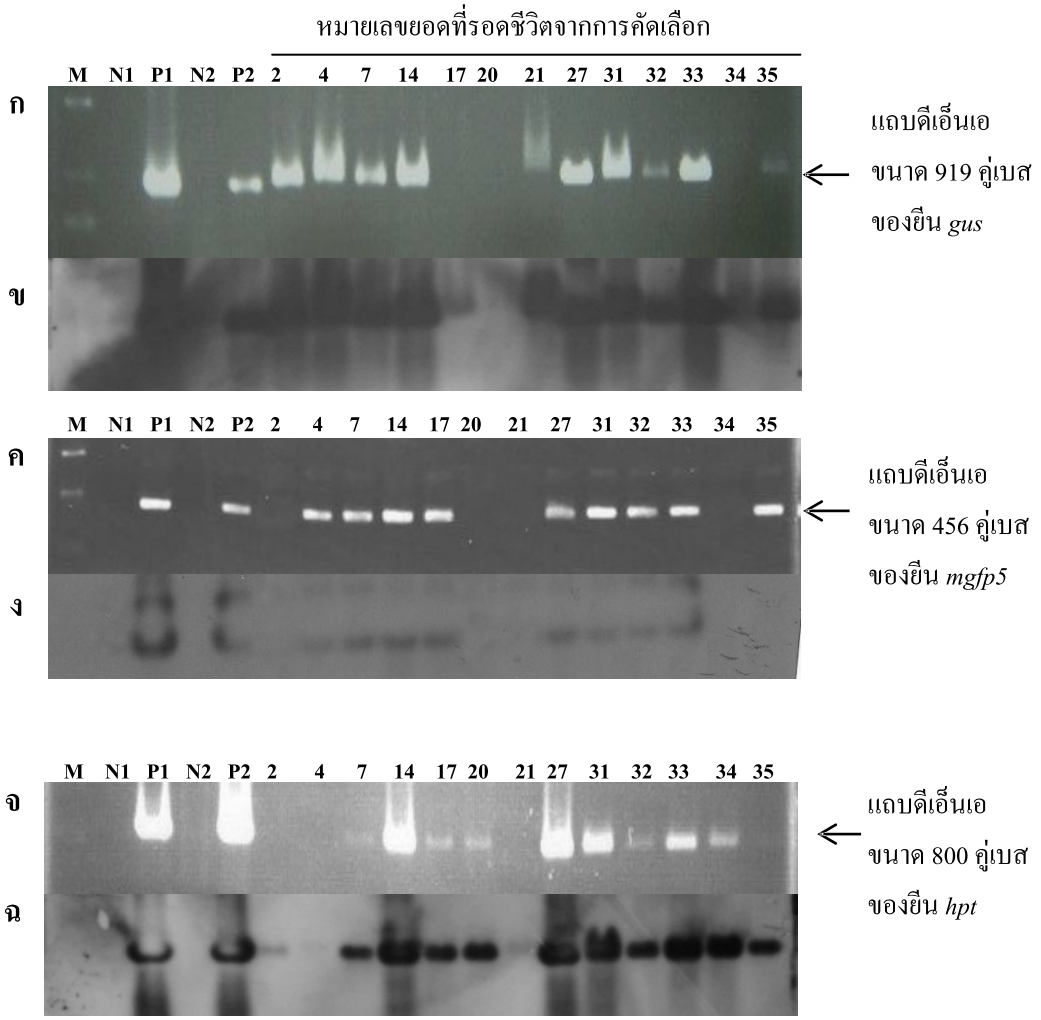
หมายเหตุ + คือ พบแถบดีเอ็นเอ

\- คือ ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

4.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในจีโนมของพรรณไม้น้ำ *C. affinis* ทำโดยสกัดดีเอ็นเอจากยอดที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน ได้แก่ ยอดหมายเลข 2 4 7 14 17 20 21 27 31 32 33 34 และ 35 และจากยอด *C. wendtii* 'Brown' หมายเลข 4 และใช้ยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนของแต่ละชนิดเป็นต้นควบคุม ซึ่งยอดดังกล่าวนี้จากผลของปฏิกิริยา PCR พบแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ขนาดแถบ 919 456 และ 800 คู่เบสตามลำดับ เท่ากับที่พบในพลาสมิด pCAMBIA1304 (ภาพที่ 17 ก ค และ จ) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จากเจลลงบนไนลอนเมมเบรน และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin (DIG) จากนั้นตรวจสอบผลโดยการนำไนลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม x-ray นาน 10-30 นาที ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยา PCR จะปรากฏแถบสีดำบนแผ่นฟิล์ม

จากผลการทดลองพบว่า ปรากฏแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มตรงกับดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบสของยีน *gus* แถบขนาด 456 คู่เบสของยีน *mgfp5* และแถบขนาด 800 คู่เบสของยีน *hpt* ตามลำดับ (ภาพที่ 17 ข ง และ ฉ) ซึ่งให้ผลเหมือนกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ใช้คือ พลาสมิด pCAMBIA1304 และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control) และไม่พบแถบดีเอ็นเอสีดำในยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและน้ำกลั่น (negative control) ซึ่งเป็นการยืนยันว่ามียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* อยู่จริงในยอดที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและแสดงให้เห็นว่ายีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* จากส่วน T-DNA ในพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่บรรจุใน *A. tumefaciens* นั้นสามารถเข้าไปรวมตัวกับจีโนมของพรรณไม้น้ำ *C. affinis* ได้ ส่วนในพรรณไม้น้ำ *C. wendtii* 'Brown' ทั้ง 6 ตัวอย่างนั้น พบว่าเฉพาะยอดหมายเลข 4 เท่านั้นที่ให้ผลเช่นเดียวกับพรรณไม้น้ำ *C. affinis* (ภาพที่ 18 ก และข) ซึ่งผลของ Southern PCR hybridization ที่ได้นั้นสอดคล้องกับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR กล่าวคือ ยอดที่พบว่ามีการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR จะพบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization เช่นกัน ซึ่งแสดงว่ายอดของพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne* เหล่านี้มีเซลล์ที่ได้รับยีนที่ถ่ายเข้าไปรวมตัวกับจีโนมของพรรณไม้น้ำจริง



ภาพที่ 17 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยอด *Cryptocoryne affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิค PCR (ก ค และ จ) เปรียบเทียบการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization (ข ง และ ฉ)

ก., ข. การมีอยู่ของยีน *gus* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส

ค., ง. การมีอยู่ของยีน *mgfp5* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 456 คู่เบส

จ., ฉ. การมีอยู่ของยีน *hpt* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส

M = 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

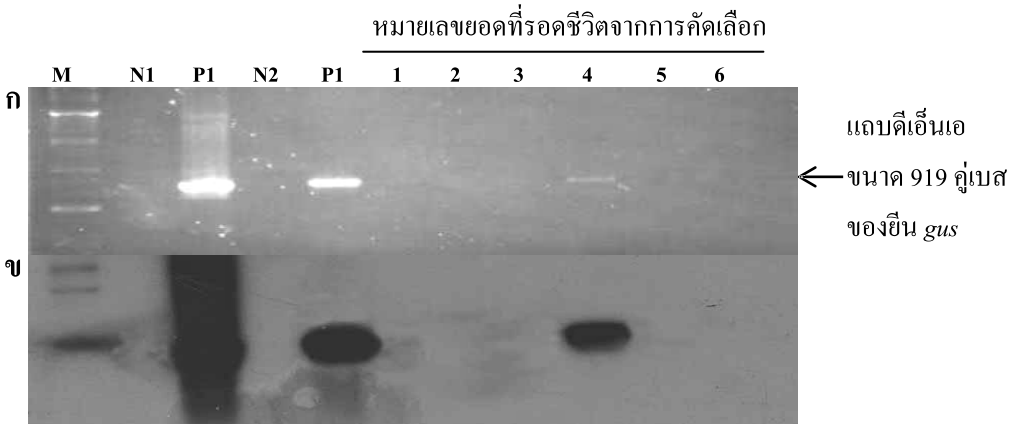
N1 = น้ำกลั่น (negative control)

P1 = ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2 = ดีเอ็นเอจาก *C. affinis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P2 = ดีเอ็นเอจากยาสูบที่มียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* (positive control)

2-35 = ดีเอ็นเอจากยอด *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 18 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* จากดีเอ็นเอที่สกัดจากยอด *Cryptocoryne wendtii* 'Brown' ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR (ก) เปรียบเทียบการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค Southern PCR hybridization (ข)

ก., ข. การมีอยู่ของยีน *gus* แสดงผลบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 919 คู่เบส

M = 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

N1 = น้ำกลั่น (negative control)

P1 = ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2 = ดีเอ็นเอจาก *C. wendtii* 'Brown' ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P2 = ดีเอ็นเอจากยาสูบที่มียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* (positive control)

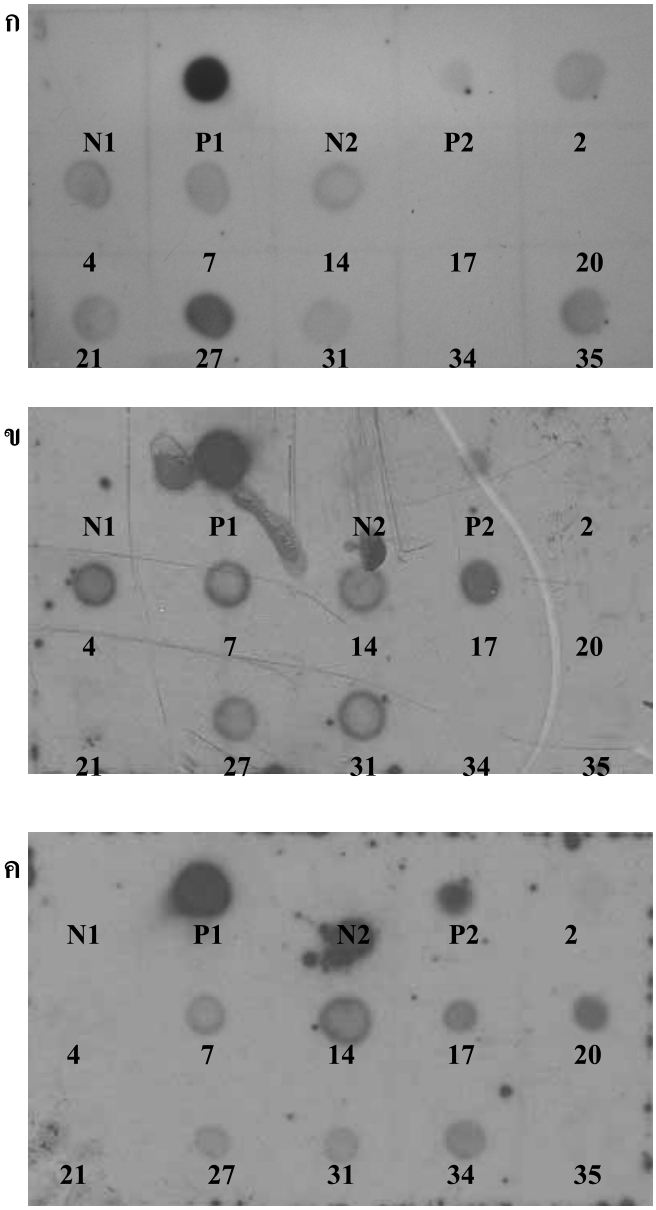
1-6 = ดีเอ็นเอจาก *C. wendtii* 'Brown' ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

4.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* โดยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* โดยเลือกสกัดดีเอ็นเอจากยอด *Cryptocoryne* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ให้ผลเป็นบวก นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยการหยดดีเอ็นเอลงบนไนลอนเมมเบรน ตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำไนลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม x-ray ซึ่งการตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจาก *Cryptocoryne* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAMBIA1304 และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเป็น positive control

จากการทดลองนี้ได้สกัดดีเอ็นเอจากยอด *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนครบทั้ง 3 ยีนจากสายยอดที่ 2 4 7 14 17 20 21 31 33 34 และ 35 เท่านั้น โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัม นำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* โดยทำการ hybridization กับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอตรวจสอบจะให้ผลเป็นสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม จากการทดลอง พบว่าปรากฏจุดสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* ในยอดหมายเลข 2 4 7 14 21 31 33 และ 35 (ภาพที่ 19ก) ยีน *mgfp5* ในยอดหมายเลข 4 7 14 17 31 และ 33 (ภาพที่ 19ข) และยีน *hpt* ในยอดหมายเลข 7 14 17 20 31 33 และ 34 (ภาพที่ 19ค) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการทำปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 5 และผลของ Southern PCR hybridization แสดงว่ายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปรวมตัวกับจีโนมของ *C. affinis* ได้อย่างถาวร

ส่วนใน *C. wendtii* ‘Brown’ นั้นจากการตรวจสอบยอดที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนปรากฏจุดสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus* ในยอดหมายเลข 4 เพียงยอดเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 20) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการทำปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 5 และผลของ Southern PCR hybridization แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปได้เข้าไปรวมตัวอยู่กับจีโนมของ *C. wendtii* ‘Brown’ อย่างถาวรเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 19 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* (ก) *mgfp5* (ข) และ *hpt* (ค) อย่างถาวร โดยเทคนิค dot blot hybridization ในยอด *Cryptocoryne affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

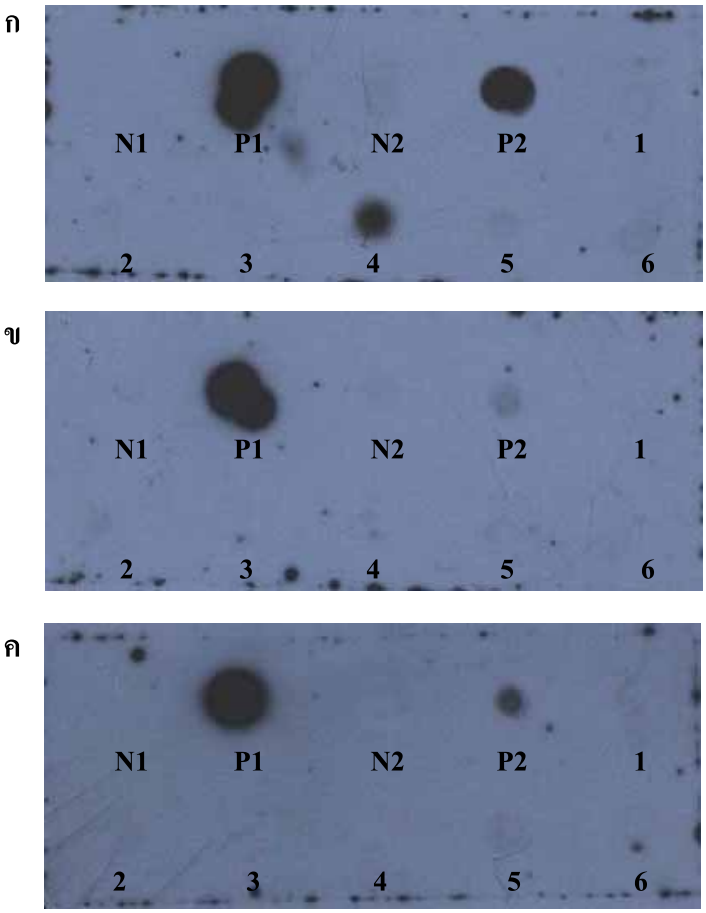
N1 = น้ำกลั่น (negative control)

P1 = ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2 = ดีเอ็นเอจาก *C. affinis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P2 = ดีเอ็นเอจากยาสูบที่มียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* (positive control)

2-35 = ดีเอ็นเอจากยอด *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 20 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* (ก) *mgfp5* (ข) และ *hpt* (ค) อย่างถาวร โดยเทคนิค dot blot hybridization ในยอด *Cryptocoryne wendtii* 'Brown' ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

N1 = น้ำกลั่น (negative control)

P1 = ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2 = ดีเอ็นเอจาก *C. wendtii* 'Brown' ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P2 = ดีเอ็นเอจากยาสูบที่มียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* (positive control)

1-6 = ดีเอ็นเอจากยอด *C. wendtii* 'Brown' ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

4.6 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในสายยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่จากยอด *Cryptocoryne affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *hpt* ครั้งที่ 2

การตรวจสอบนี้เพื่อยืนยันผลการมีอยู่ของยีนเพิ่มเติมโดยได้นำแต่ละยอดของ *C. affinis* ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกและตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR แล้วให้ผลเป็นบวกจำนวน 11 สายยอด (ยกเว้นสายยอดหมายเลข 27 และ 32 ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากเกิดการปนเปื้อนเชื้อราระหว่างการเพาะเลี้ยง) ไปชักนำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นอีกครั้งบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากนั้นจึงสุ่มยอดที่เกิดใหม่จากสายยอดเดิมมาสายยอดละ 10 ยอด นำไปตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR ซ้ำอีกครั้ง พบว่าสามารถตรวจพบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* แตกต่างกันในแต่ละสายยอด (ตารางที่ 6)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR เป็นครั้งที่ 2 แล้วพบว่ามีบางสายยอดของ *C. affinis* ที่ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนทั้ง 3 ยีน หรือบางยอดพบเพียงยีนใดยีนหนึ่งนั้นอาจเนื่องมาจากยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นั้นเกิดจากเซลล์ส่วนที่ไม่ได้รับยีนจริง แต่สามารถเจริญได้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในบางสายยอดไม่มีการคงอยู่ของยีนเลย ดังนั้นการถ่ายยีนครั้งนี้อาจยืนยันผลได้ว่าการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* นั้นไม่ได้เกิดขึ้นในทุกเซลล์ เป็นผลให้ได้ต้นดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้มีลักษณะเป็น chimeras

การพบลักษณะ chimeras ในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อขนาดใหญ่นี้มีรายงานวิจัยหลายงานเช่น งานวิจัยของ Voisey *et al.* (1994) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ white clover (*Trifolium epens* L.) โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 พบว่าต้นที่เจริญบนอาหารคัดเลือกมีลักษณะเป็น chimeras อาจเป็นไปได้ว่ามีการเกิดยอดใหม่ในช่วงของการปลูกเชื้อ เนื่องจากในอาหารที่ใช้ในการปลูกเชื้อได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ทำให้ยอดที่เกิดขึ้นใหม่นี้มีโอกาสเกิดกระบวนการส่งถ่ายยีนในช่วงของการเกิดยอดใหม่นี้ด้วย ซึ่งแต่ละยอดไม่ได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์เดียวกัน อาจมีการพัฒนาแยกกันออกไป มีผลทำให้ไม่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ยอดทุกๆ ยอดได้อย่างสม่ำเสมอ ในการทดลองครั้งนี้ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อปลายยอดของ

C. affinis และ *C. wendtii* 'Brown' มาใช้ในการถ่ายยีนนั้นได้นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็นการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดนั้นมีการตื่นตัว (active) เกิดเป็นยอดใหม่ได้ง่าย จึงอาจเป็นไปได้ว่าการกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ในช่วงของการปลูกเชื้อเช่นกันส่งผลให้เกิดยอดใหม่ที่มีลักษณะเป็น chimeras

เนื่องจากผลของการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีบางสายยอดที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *hpt* จึงได้คัดเลือกยอด *C. affinis* ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ซ้ำอีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผลการแสดงออกของยีน *hpt* ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำสายยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่จากยอด *C. affinis* เดิมที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนมาคัดเลือกบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าหลังจากการคัดเลือกเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตปกติ แต่หลังจากย้ายเนื้อเยื่อมาคัดเลือกต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อีก 2 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 ของการคัดเลือกรอบนี้ทุกยอดแสดงอาการใบเหลืองและหยุดการเจริญเติบโต เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในสัปดาห์ที่ 4 จากการคัดเลือกซ้ำนี้พบว่ายอด *C. affinis* ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ไม่สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B ได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 7) อาจเกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ในความเข้มข้นที่สูงเกินไปมีผลทำให้บางต้นที่แม้จะมียีน *hpt* ตายได้เช่นกัน เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นสามารถทนต่อสารปฏิชีวนะในระดับความเข้มข้นระดับหนึ่งเท่านั้น

แม้ว่าการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดซึ่งเป็นเนื้อเยื่อขนาดใหญ่นั้นมักมีรายงานว่า ทำให้เกิดปัญหาการได้ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนปนมาด้วย ทำให้การถ่ายยีนไม่ประสบผลสำเร็จ แต่ Zhong *et al.* (1996) กล่าวว่าในพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดมาใช้ในการถ่ายยีนนั้นแม้ว่าจะทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า chimeras แต่สามารถแก้ไขได้โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่นใช้ TDZ ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ออกฤทธิ์คล้ายสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดี ช่วยชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและใช้วิธีการคัดเลือกต้นที่เกิดขึ้นซ้ำบนอาหารคัดเลือกอีกครั้งเพื่อกำจัดต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหรือต้นที่เป็น chimeras ที่เจริญปะปนมาและควร subculture หลายๆ ครั้งก่อนนำมาคัดเลือกรอบที่ 2 เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีความอ่อนแอกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเป็นต้นได้เร็ว

กว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน การชักนำให้เกิดยอดใหม่หลายๆ ครั้งจะช่วยเปิดโอกาสให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนพัฒนาเป็นต้นที่ไม่มีลักษณะเป็น chimeras ได้

แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จในการได้ต้นที่ไม่เป็น chimeras อาจเนื่องจากก่อนคัดเลือกรอบที่ 2 นั้นได้ชักนำให้เกิดยอดใหม่เพียงครั้งเดียวซึ่งอาจน้อยเกินไป

สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดนั้นเริ่มนำมาใช้ครั้งแรกเมื่อปี 1988 โดย McCabe และคณะ ต่อมา Hirochika (1993) ได้รายงานข้อดีของการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอด คือ เกิดความแปรผันของประชากรเซลล์ (somoclonal variation) ต่ำ และยังมีรายงานอีกว่าทำให้การเจริญเป็นต้นใหม่นั้นเกิดขึ้นได้เร็วโดยไม่ผ่านแคลลัส (Bregitzer and Tonks, 2003) และมีรายงานยืนยันจากการทดลองของ Weber *et al.* (2003) ที่ได้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของทานตะวันโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะและสร้างบาดแผลโดยวิธี sonication และใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ช่วยย่อยผนังเซลล์ เช่นเอนไซม์ cellulase และ pectinase พบว่าต้นที่เจริญเป็นต้นใหม่นั้นจะเกิด somoclonal variation ต่ำ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ เมธินี และคณะ (2549) ที่ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวหอมมะลิ KDML105 และพบว่ามีข้อจำกัดในการเจริญเป็นต้นใหม่ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุ์จากแคลลัสหรือโปรโตพลาส เนื่องจากยังจำเพาะต่อข้าวบางพันธุ์เท่านั้น และนอกจากนี้การเจริญเป็นต้นใหม่ของต้นข้าวโดยผ่านแคลลัสยังก่อให้เกิด somoclonal variation ทำให้ต้นข้าวที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่ผิดไปจากเดิม

ดังนั้นในกรณีของพืชที่มีข้อจำกัดเรื่องการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสหรือเซลล์เดี่ยวนั้น การเลือกใช้ปลายยอดเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายก็เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่ง แต่จำเป็นต้องหาวิธีแก้ปัญหาการเกิด chimeras เพื่อให้ได้ต้นที่เป็น solid transformant

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ในสายยอดที่พัฒนามาจากสายยอด *Cryptocoryne affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนอย่างไม่สมบูรณ์ จำนวน 11 ยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดยอด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (+ คือ พบแถบดีเอ็นเอ, - คือ ไม่พบแถบดีเอ็นเอ)

หมายเลขสายยอดเดิม	ยีน	สายยอดที่พัฒนามาใหม่										เปอร์เซ็นต์ที่พบการมีอยู่ของยีน (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	*gus*	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	70
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	hpt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
4	*gus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	mgfp5	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	20
	hpt	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	20
7	*gus*	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	30
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	10
	hpt	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	20
14	*gus*	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	30
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	10
	hpt	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	20
17	*gus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	hpt	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	30
20	*gus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	hpt	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	10
21	*gus*	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	70
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	hpt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
31	*gus*	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	60
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	30
	hpt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	20
33	*gus*	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	60
	mgfp5	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	70
	hpt	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	50
34	*gus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	hpt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	10
35	*gus*	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	60
	mgfp5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	hpt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

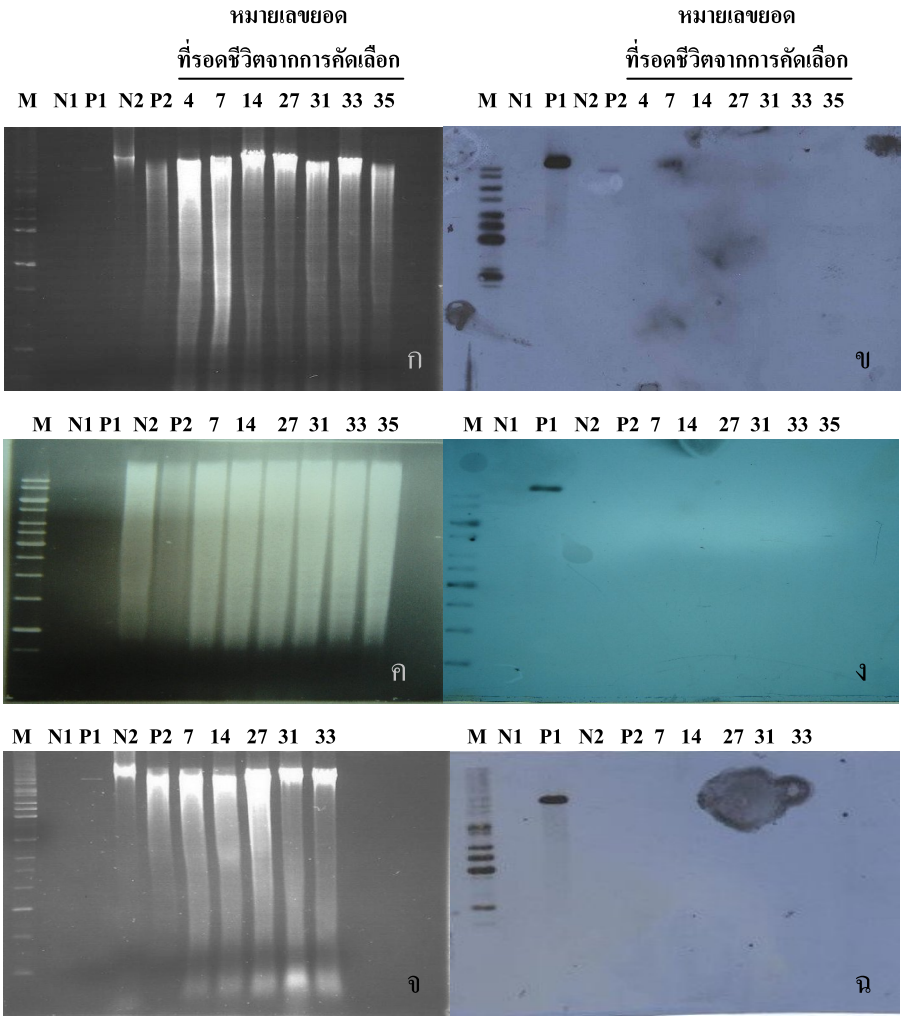
ตารางที่ 7 จำนวนยอดของ *Cryptocoryne affinis* ที่เกิดขึ้นใหม่จากยอดเดิมและจำนวนยอดที่รอดชีวิตภายหลังคัดเลือกครั้งที่ 2 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์)

หมายเลขยอดเดิม	จำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่	จำนวนยอดที่คัดเลือกบนอาหารคัดเลือก	จำนวนยอดที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก
2	34	24	0
4	17	7	0
7	25	15	0
14	19	9	0
17	26	16	0
20	16	6	0
27	27	17	0
31	26	16	0
33	22	12	0
34	19	9	0
35	21	11	0

4.7 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* โดยเทคนิค Southern hybridization

การตรวจสอบการเข้ารวมตัวของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* กับจีโนมของ *C. affinis* ด้วยเทคนิค Southern hybridization เพื่อยืนยันว่ามียีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* เข้าไปรวมตัวกับจีโนมของ *C. affinis* โดยเลือกทดสอบเฉพาะกับยอดที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ให้ผลเป็นบวกทั้ง 3 ยีน ได้แก่ยอดหมายเลข 4 7 14 27 31 33 และ 35 และใช้ดีเอ็นเอจาก *C. affinis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAMBIA1304 และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเป็น positive control

จากการนำจีโนมิคดีเอ็นเอประมาณ 20 ไมโครกรัม ที่สกัดได้จาก *C. affinis* ในแต่ละสายยอดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII แล้วแยกขนาดบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีอิเลกโตรโฟเรซีส (ภาพที่ 21 ก ค จ) และนำไปวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* โดยเทคนิค Southern hybridization (ภาพที่ 21 ข ง ฉ) ผลจากการ hybridization พบว่า *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนที่ได้จากการทดลองนี้ไม่ปรากฏแถบสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบ คือพลาสมิด pCAMBIA1304 (ภาพที่ 21 ข ง ฉ) ดังนั้นจึงไม่สามารถกล่าวได้ว่ายอด *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนได้รับยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* จากพลาสมิด pCAMBIA1304 เข้าไปจริง ถึงแม้ว่าจะสามารถตรวจพบการคงอยู่ของยีน *gus* *mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR เทคนิค Southern PCR hybridization และ dot blot hybridization ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอจากสายยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ภายหลังจากการนำยอดที่ได้รับการถ่ายยีนมาเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นยอดที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างไม่สมบูรณ์มีลักษณะเป็น chimeras และมีบางสายยอดไม่พบการมีอยู่ของยีน (ตารางที่ 6) ดังนั้นสัดส่วนของเซลล์ที่มียีนที่ถูกถ่ายเข้าไปมีน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มียีนที่ถูกถ่ายเข้าไป ทำให้โอกาสที่จะพบการมีอยู่ของยีนจึงน้อยไปด้วยจึงไม่สามารถตรวจพบแถบสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มได้



ภาพที่ 21 การตรวจสอบการรวมตัวของยีนกับจีโนมของ *Cryptocoryne affinis* ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Southern hybridization

ก., ข ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *gus*

ค., ง. ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *mgfp5*

จ., ฉ ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *hpt*

M = 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

N1= น้ำกลั่น (negative control)

P1= ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA1304 (positive control)

N2= ดีเอ็นเอของ *C. affinis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P2= ดีเอ็นเอจากยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน pCAMBIA1304 (positive control)

4 7 14 27 31 33 35 = ดีเอ็นเอของ *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

4.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5*

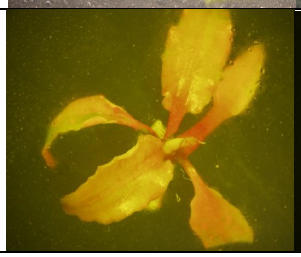
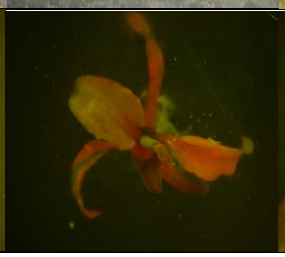
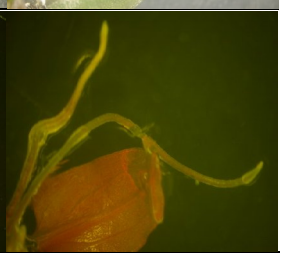
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5* ทำโดยนำเนื้อเยื่อ *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus รุ่น SZX12) ซึ่งสามารถปลดปล่อยแสงในสภาพ excitation ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร และปลดปล่อยแสงในสภาพ emission ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร พบว่าใบของ *C. affinis* ที่ผ่านการถ่ายยีนเกิดการเรืองแสงสีแดงและสีเหลือง แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียว แสดงว่าไม่มีการแสดงออกของยีน *mgfp5* ที่สามารถตรวจพบได้ชัดเจน (ภาพที่ 22) ซึ่ง Garabagi and Strommer (2000) รายงานว่าเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการถ่ายยีนอาจเกิดการเรืองแสงสีเหลืองได้ เมื่อนำไปตรวจสอบการเรืองแสงด้วยกล้อง stereo microscope ที่สามารถปลดปล่อยแสงสีน้ำเงินในสภาพ excitation ที่ความยาวคลื่น 470-490 นาโนเมตร และปลดปล่อยแสงสีเขียวในสภาพ emission ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และการตรวจสอบการเรืองแสงสีเขียวของโปรตีน gfp อาจเนื่องมาจากคลอโรฟิลล์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชสามารถเรืองแสงภายใต้แสงคลื่นสั้นเห็นเป็นสีแดงโดยเฉพาะพืชที่มีสีเขียวเข้มการเรืองแสงจะมากขึ้น ส่งผลให้ความไวและประสิทธิภาพของการตรวจวัดการเรืองแสงสีเขียวของโปรตีน gfp ลดลง (ชาติชาย, 2547) ซึ่งยืนยันได้จากจากการตรวจสอบบริเวณรากของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *mgfp5* ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยและใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ พบว่าตรวจพบการเรืองแสงสีเขียวและสีเหลืองได้ชัดเจน

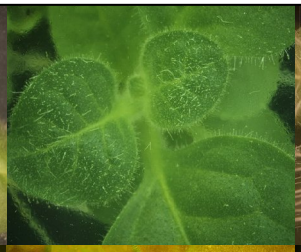
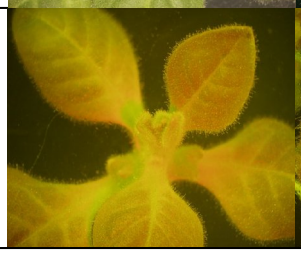
สำหรับพรรณไม้น้ำที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นผลที่ได้เป็นไปตามความคาดหมาย คือ ตรวจพบเกิดการเรืองแสงสีแดง (red-autofluorescence) ทั้งใบ เนื่องมาจากในใบพืชที่มีอายุมากจะมีการสะสมคลอโรฟิลล์มากขึ้น เมื่อนำใบพืชดังกล่าวไปตรวจวัดการเรืองแสงภายใต้ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ทำให้คลอโรฟิลล์เกิดการเรืองแสงสีแดง ได้ชัดเจน (Halfhill *et al.*, 2001)

อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ใบของ *C. affinis* มีสีสันที่หลากหลาย เช่น น้ำตาลแดง แดงเข้ม เขียวอมแดง เขียวอ่อน เขียวเข้ม และสีแดงสดบริเวณใต้ใบ ซึ่งรงควัตถุหลายชนิดที่มีในใบพืชชนิดนี้อาจมีผลในการบดบังหรือรบกวนการเรืองแสงของโปรตีน gfp ที่อยู่ในเซลล์ของพืชนั้นทำให้ไม่สามารถตรวจวัดการเรืองแสงสีเขียวได้ชัดเจน โดย Oosumi *et al.* (2006) รายงานว่าการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gfp* ในชิ้นส่วนพืชนั้นควรตรวจสอบในเนื้อเยื่อมีการสะสมคลอโรฟิลล์และแอนโทไซยานินน้อย เช่น ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ ปลายใบ ราก กลีบดอก ผลอ่อน และโคนต้น เป็นต้น หรือพิจารณาการใช้โปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ทำให้มีการแสดงออกได้มากก็จะช่วยให้ตรวจพบการเรืองแสงได้มากขึ้น ซึ่งในการทดลองของ Sairam

et al. (2003) ได้นำโปรโมเตอร์แอคตินที่ได้จากข้าวมาใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *gfp* ในข้าวโพดที่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้พบการเรืองแสงสีเขียวได้ทั่วทั้งใบ เกสรตัวผู้และละอองเกสร ซึ่งทำให้ทราบว่าการใช้โปรโมเตอร์ที่ได้จากพืชที่เหมาะสมจะช่วยให้ประสิทธิภาพของการตรวจวัดการเรืองแสงสีเขียวของยีน *gfp* สูงขึ้น

ในการทดลองนี้ใช้โปรโมเตอร์คือ CaMV35S ซึ่งแม้ว่าจะเป็นโปรโมเตอร์ที่มีรายงานว่าสามารถแสดงออกได้ทุกส่วนของพืช แต่จากการทดลองของ รักชนก (2549) ที่ได้ใช้โปรโมเตอร์ CaMV35S ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าการแสดงออกของยีน *gus* ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีนในระยะยอดอ่อนขนาดเล็กอายุ 1 เดือน สามารถย้อมติดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อที่มีชีวิตได้ทุกส่วนและชัดเจนมาก แต่เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนต้นอ่อนอายุ 4 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อส่วนของรากยังย้อมติดสีน้ำเงินได้ดี แต่ในใบนั้นย้อมติดสีน้ำเงินได้เพียงบางส่วนเท่านั้น และการติดสียังไม่เข้มเท่าในต้นอ่อนอายุ 1 เดือนอีกด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลของการทดลองครั้งนี้ที่ใช้โปรโมเตอร์ CaMV35S ควบคุมการแสดงออกของยีน *mgfp5* จึงอาจอธิบายได้ว่าสาเหตุที่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวได้ชัดเจนบนแผ่นใบของ *Cryptocoryne* นั้นอีกเหตุผลหนึ่งอาจเนื่องมาจากผลของการควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ CaMV35S ที่ส่งผลให้การแสดงออกของยีน *mgfp5* ที่ใบอายุมากได้น้อย

สภาพแสง	*C. affinis* (negative control)	*C. affinis* (ยอดหมายเลข 14)	*C. affinis* (ยอดหมายเลข 31)
ปกติ			
excitation 488 nm emission 510 nm			

สภาพแสง	ยาสูบ (negative control)	ต้นยาสูบ (positive control)	รากยาสูบ (positive control)
ปกติ			
excitation 488 nm emission 510 nm			

ภาพที่ 22 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5* ใน *Cryptocoryne* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus รุ่น SZX12) ที่ตรวจสอบภายใต้แสงปกติและสภาพแสง excitation 488 นาโนเมตร และ emission 510 นาโนเมตร

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' เพื่อเพิ่มจำนวนยอดได้มาก ในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* ลงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. wendtii* 'Brown' นั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ทั้งสายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีผลต่อการเกิดยอดของพรรณไม้น้ำ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' น้อย คือ ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่เหมาะสมในการคัดเลือกเนื้อเยื่อ *C. wendtii* 'Brown' ที่ได้รับการถ่ายยีน คือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับ *C. affinis* ใช้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวนี้สามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์

วิธีการถ่ายยีนที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ *Cryptocoryne* คือใน *C. affinis* ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ส่วนใน *C. wendtii* 'Brown' ใช้สายพันธุ์ AGL-1 และมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ วิธีการทำบาดแผลโดยการใช้มีดผ่าครึ่งชิ้นเนื้อเยื่อร่วมกับการ sonicate นาน 5 วินาที กระตุ้นด้วยสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารปลูกเชื้อ และอาหารเลี้ยงร่วมกับเชื้อ โดยใช้เวลาในการปลูกเชื้อ (inoculation) นาน 2 ชั่วโมง และเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) นาน 3 วัน วิธีการที่กล่าวนี้ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด เมื่อพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว

จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' โดยใช้ปัจจัยต่างๆ ที่ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาข้างต้นโดยใช้เนื้อเยื่อ *Cryptocoryne* ชนิดละ 240 ชิ้น แล้วคัดเลือกเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือก พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* สามารถรอดชีวิตและเกิดยอดใหม่ได้ 35 ยอด ส่วน *C. wendtii* 'Brown' สามารถรอดชีวิตและเกิดยอดใหม่ได้ 6 ยอด

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในยอดที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกภายหลังจากการถ่ายยีนและสายยอดที่พัฒนาขึ้นมาใหม่

ภายหลังจากนำยอดที่ได้รับการถ่ายยีนมาเพิ่มจำนวน ซึ่งเกิดจากการที่ยอดดังกล่าวมีลักษณะเป็น chimeras ส่วนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization นั้น ผลที่ได้สอดคล้องกับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR กล่าวคือ ยอดที่พบว่ามีการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR จะพบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization เช่นกัน ซึ่งจะปรากฏแถบสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม แต่เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* โดยเทคนิค Southern hybridization ในพรรณไม้น้ำ *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน ไม่พบการมีอยู่ของยีน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus รุ่น SZX12) ที่ปล่อยแสงในสภาพ excitation ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร และปลดปล่อยแสงในสภาพ emission ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร พบว่าใบของ *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเกิดการเรืองแสงสีแดงและเหลือง แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กัญจนา แซ่เตียว. 2549. **การถ่ายยีน *VP1* จากเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่ถั่วฮามาต้า.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กาญจนรี พงษ์ฉวี, พัฒนพงศ์ ชูแสง และ วิจารณ์ ทองมีเอียด. 2542. การขยายพันธุ์ผมหอมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, *ใน* **เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2542**. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ.

จารุวรรณ จาติเสถียร. 2546. **การถ่ายยีน *G11, OsMADS1* และ *GFP* เข้าสู่ข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เทคนิคการยิงร่วมด้วยเครื่องยิงอนุภาค.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉัตรนภา ข่มอาวุธ. 2545. **การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเทคนิคที่เหมาะสมในการทำบาดแผลเพื่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในถั่วเขียว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาติชาย แจ้งเสน. 2547. **การตรวจกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี GFP MICROPLATE ASSAY**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ฐารินี สุสันทัด. 2547. **การศึกษาการสร้างเวกเตอร์ที่มียีนรายงานผล GFP และการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม**. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

นิตย์ศรี แสงเดือน และ สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2548. **เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2550. **พรรณไม้น้ำสวยงามที่ผลิตในประเทศไทย**. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/aquaorna/aquatic%20plants.htm, 28 มีนาคม 2550.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2537. **การปลูกและดูแลรักษาพรรณไม้น้ำ พรรณไม้เพื่อการส่งออก**. สำนักพิมพ์เพชรกะรัต จำกัด, กรุงเทพฯ.

พัฒน์ พิชาน. 2549. **สวนไม้น้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แนวเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

พรพิมล สุริยภัทร และ ดวงจันทร์ เกษบุตร. 2549. ผลของไธไดอะซูรอนที่ให้ในระยะสั้นและชนิดชิ้นส่วนต่อการเพิ่มจำนวนยอดของปทุมมาลูกผสม. **ว. วิทย์. กษ.** 37 (พิเศษ): 829-832.

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ. 2546. **การขยายพันธุ์ใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne balansae*) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

_____ และ อรุณี รอดลอย. 2542. ผลของ α - napthaleneacetic acid (NAA) และ 6-benzylaminopurine (BA) ต่อการเกิดต้นอ่อนของใบพายศรีราชา (*Cryptocoryne wendtii*), น. 15. *ใน* **เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 2/2542**. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

เมธินี ศรีวัฒนกุล, จารุวรรณ จาติเสถียร, นิติมา อยู่คงแก้ว และ จรัญญา ณรงคะชวนะ. 2549. **การพัฒนาการฝากถ่ายยีนสู่ข้าวโดยระบบการเลี้ยงยอดอ่อน**. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

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

รสา หงรัตน์, สุรียา ตันติวิวัฒน์ และ มาลี ณ นคร. 2548. การขยายพันธุ์ต้นใบพาย (*Cryptocoryne cordata*) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2547. การขยายพันธุ์บอนแดง (*Cryptocoryne blassii*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, น. 34. *ใน* **เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2547**. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุกัญญา พริกจำรูญ. 2548. **คู่มือการเพาะเลี้ยงและส่งออกพรรณไม้น้ำ-ปลาสวยงาม**. สำนักพิมพ์นีออน บุ๊ค มีเดีย, นนทบุรี.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2543. **พรรณไม้น้ำในประเทศไทย**. สำนักพิมพ์อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พัชลิชชิ่ง, กรุงเทพ ฯ.

สุมนา เหลืองฐิติกาญจนา. 2550. **การถ่ายยีน *VP1* ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่หญ้ารูซี่โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2543. เทคนิคการถ่ายยีนกับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, น. 109-111. *ใน* **เอกสารประกอบการการสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13: เทคโนโลยีใหม่พืชใหม่.** สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

_____ และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร, *ใน* **เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. **ดีเอ็นเอเทคโนโลยี**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม, พิษณุโลก.

Ahlandsberg, S., P. Sathit, C. Sun and C. Jansson. 1999. *Green fluorescent protein* as a reporter system in the transformation of barley cultivars. **Physiol. Plant.** 107: 194-200.

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

Al-Forkan, M., J.B. Power, P. Anthony, K.C. Lowe and M.R. Davey. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Bangladeshi *indica* rice**. Cell. Mol. Biol. Lett.** 9: 287-300.

Almeida, W.A.B., F.A.A.M. Filho, B.M.J. Mendes, A. Pavan and A.P.M. Rodriguez. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* L. and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola** 60: 23-29.

Alsheikh, M.K., H.P. Suso, M. Robson, N.H. Battey and A. Wetten. 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens.* **Plant Cell Rept**. 20: 1173-1180.

Amoah, B.K., H. Wu, C. Sparhs and H.D. Jones. 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. **J. Exp. Bot.** 52:1135-1142.

Anuradha, T.S., S.K. Jami, R.S. Datla and P.B. Kirti. 2006. Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using cotyledonary node as explant and promoterless *gus::nptII* fusion gene base vector. **J. Biosci.** 31: 235-246.

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

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

Atichart, P., S. Bunnag and P. Theerakulpisut. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium seundum* (Bl.) Lindl with *Antisense ACC Oxidase*. **Asian J. Plant Sci**. 6: 1065-1071.

Batra, S. and S. Kumar. 2003. *In vitro* high frequency plant regeneration in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). **J. Plant Biol.** 29: 191-194.

Binns, A.N. and M.F. Thomashow. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Ann. Rev. Microbiol.** 42: 575-606.

Bregitzer, P. and D. Tonks. 2003. Inheritance and expression of transgenes in barley. **Crop Sci.** 42:1303-1308.

Caboni E., M.G. Tonelli, P. Lauri, S.D. Angeli and C. Damiano. 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 59: 1-7.

Cao, X., Q. Liu, L.J. Rowland and F. A. Hammerschlag. 1998. Gus expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. **Plant Cell Rept.** 18: 266-270.

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

Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y. Kim and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phaleanopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Sci. Hort**. 96: 213-224.

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

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

Cooper, G.M. 2000. **The Cell: A Molecular Approach.** 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., U.S.A. 689 p.

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

Cutler, S.R., D.W. Ehrhardt, J.S. Griffitts and C.R. Somerville. 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cell *Arabidopsis* at a high frequency. **PNAS**. 97: 3718-3723.

Danilova, S.A. and Y.I. Dolgikh. 2005. Optimization of Agrobacterial (*Agrobacterium tumefaciens*) transformation of maize embryogenic callus. **J. Plant Physiol.** 52: 535-541.

Delbreil, B., P. Guerche and M. Jullein. 1993. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. long term embryogenic callus and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Rept**. 12: 129-132**.**

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 12: 13-15.

Eady, C.C., R.J. Wel and C.E. Lister. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Cell Rept**. 19: 376-381.

Ellis, A., W. Yang, Y. Ye and J.J. Yang. 2006. **Model structure of GFP *de novo* design calcium binding site**. Available Source: http://Chemistry.gsu.edu/faculty/Yang/Image/gfp-1b9c-site.jpg, July 16, 2006.

Finer, K.R. and J.J. Finer. 2000. Use of *Agrobacterium* expressing *green fluorescent protein* to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation treated soybean cotyledons. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 406-410.

Gao, Z., X. Xie, Y. Ling, S. Muthukrishnan and G.H. Liang. 2005. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated sorghum transformation using a mannose selection system. **Plant Biol**. 3: 591-599.

Garabagi, F. and J. Strommer. 2000. *Green fluorescent protein* as an all-purpose reporter in petunia. **Plant Mol. Biol. Rep.** 18: 219-226**.**

Godwin, I.D., T. Gordon, B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newburry. 1991. The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species**. Plant Cell Rept**. 9: 671-675.

Halfhill, M. D., H.A. Richards, S.A. Mabon and C.N. Stewart, Jr. 2001. Expression of *GFP* and *bt* transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa.* **Theor. Appl. Genet.** 103: 659-667.

Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumasiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant J**. 6: 271-282.

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

Hirochika, H. 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. **EMBO J** 12: 2521-2528.

Hood, E.E., S.B. Gelvin, L.S. Melchers and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research** 2: 208-218.

Hooykass, P.J.J. and R.A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Mol. Biol. Rep**. 19: 15-30.

Humara, J.M., M. López and R.J. Ordás. 1999. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. **Plant Cell Rept**. 19: 51-58**.**

Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei and T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens.* **Nat. Biotechnol**. 14: 745-750.

Jacobsen, H.J. 1993. Biotechnology in grain legumes. Current state and critical remarks. **Grain Legumes** 2: 12-13.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric gene in plant : the *gus* gene fusion system. **Plant Mol. Biol. Rep**. 5: 378-405.

_____, T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions : *beta-glucuronidase* as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J.** 6: 3901-3907.

Jonda' s, S. 1996. **PPS2 project structure and function of GFP**. Available Source: http://www.crypst.bbk.ac.uk/PPS2/project/jonda/chromoph.htm. December 29, 2007.

Kamate, K. , I.D. Rodriquez-Liorente, M. Scholte, P. Durand, P. Ratet, E. Kondorosi, A. Kondorosi and T.H. Trinh. 2000. Transformation of floral organs with *GFP* in *Medicago truncatula*. **Plant Cell Rep**. 19: 647-653.

Kane,. M.E., E.F. Gillman, M.A. Jenks and T.J. Sheehan. 1990. Micropropagation of aquatic plant *Cryptocoryne lucens.* **Hort. Sci**. 25: 687-689.

_____, G.L. Davis, D.B. McConnell and J.A. Gargiulo. 1999. *In vitro* propagation of *Cryptocoryne wendtii.* **Aquat. Bot**. 63: 197-202.

Karsedis, D. and R.L. Geneve. 1997. Multiple shoot formation from cotyledonary node segments of Eastern redbud. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 47: 247-254.

Ke, X.Y., A.C. McCormac, A. Harvey, D. Lonsdale, D.F. Chen and M.C. Elliiott. 2002. Manipulation of discriminatory T-DNA delivery by *Agrobacterium* embryos of barley and wheat. **Euphytica** 126: 333-343.

Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and T. Kumashiro. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant J**. 10: 165-174.

_____, Y. Ishida, T. Kumashirot and T. Kubo. 1998. Advances in cereal gene transfer. **Curr. Opinion in Plant Biol.** 1: 161-165.

Kondo, T., H. Hasegawa and M. Suzuki. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Plant Cell Rep**. 19: 989-993.

Lazo, G.R., P.A. Stein and R.A. Ludwig. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium.* **Bio/Technology** 9: 963-967.

Lee, S.H., D.G. Lee, H.S. Woo, K.W. Lee, D.H. Kim, S.S. Kwak, J.S. Kim, H. Kim, K. Ahsan, H.S. Choi, J.K. Yang and B.H. Lee. 2006. Production of transgenic orchardgrass *via Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissue. **Plant Sci.** 171: 408-414..

Liau, C. H., S.J. You, V. Prasad, H.H. Hsiao, J.C. Lu, N.S. Yang and M.T. Chan. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an Oncidium orchid. **Plant Cell Rep**. 21: 993-998.

Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. **Physiol. Plant**. 18: 100-127.

Mathais, R.J. and L.A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). **Plant Sci.** 46: 217-223.

May, G.D., R. Afza, H.S. Mason, A. Wiecko, F.J. Novak and C.J. Arntzen. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants *via Agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/Technology** 13: 486-492.

Melchers, L.S., A.J.G. Regenburg-Tuink, R.A. Schilpeoot and P.J.J Hooykaas. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. **Mol. Microbiol.** 3: 969-977.

Men, S., X. Ming, R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Dendrobium* orchid. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 75: 63-71.

Mendes, B.M.J., R.L. Boscariol, F. De, A.A.M. Filho and W.A.B. de Almeida. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesq. Agropec. Bras.** 37: 955-961.

Meurer, C.A., R.D. Dinkins and G.B. Collins. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. **Plant Cell Rep.** 18: 180-186.

McCabe, D., W. Swain, B. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Bio/Technology**. 6:923-925.

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

Mo, X. and Q. Jiang. 2003. Study on rapid proliferation and color appearing of tropical aquatic grass *Cyptocoryne wendtii.* **Acta Agiculturae Zhejiangensis**. 15:91-94.

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

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

Oosumi, T., H.A. Gruszewshi, L.A. Blischak, A.J. Baxter, J.L. Shuman and V. Shulaev. 2006. High efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for function genomics. **Planta.** 223: 1219-1230.

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

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

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

_____and G. Spangenberg. 1995. Gene transfer to Plants**. Springer-Verlag**, Berin. 361 p.

Quaedvlieg, N.E.M., H.R.M. Schlaman, P.C. Admiraal, S.E. Wijting, J. Stougaard and H.P. Spaink. 1998. Fusions between *green fluorescent protein* and *β-glucuronidase* as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. **Plant Mol. Biol. Rep.** 38: 861-873.

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

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

Saharan, V., C.Y. Ram, Y. Neelam and R. Khushi. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa* L.). **Afr. J. Biotechnol**. 3: 572-575.

Sairam, R.V., M. Parani, G. Franklin, Z. Lifeng, B. Smith, J. MacDougall, C. Wilber, H. Sheikhi, N. Kashikar, K. Meeker, D. Al-Abed, K. Berry, R. Vierling and S.L. Goldman. 2003. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea may* L. transformation. **Genome.** 46: 323-329.

Samiphak, K. and N. Siwarungson. 2006. Transformation and expression of *green fluorescent protein* and barley stress-induced embryogenic *hva1* gene in *Indica* rice KDML 105 by *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 31: 33-48.

Santarém, E.R., H.N. Trick, J.S. Essig and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: Optimization of transient expression. **Plant Cell Rep**. 17: 752-759.

Sheikholeslam, S.N. and D.P. Weeks. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens.* **Plant Mol. Biol.** 8: 291-298.

Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence protein, will travel. **Plant cell.** 1699-1710.

Shimomura, O. 2007. **GFP-Green Fluorescent Protein History**. Available Source: http://www.conncoll.edu-ccacad-zimmer-GFP-ww-images-aequorin-2.jpg, December 29, 2007.

Siemering, K.R., R. Golbik and J. Haseloff. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. **Curr. Biol.** 6: 1653-1663.

Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Sci.** 35: 301-309.

Somleva, M.N., Z. Tomaszewski and B.V. Conger. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Switchgrass. **Crop Sci**. 42: 2080-2087.

Stachel, S.E., E. Messens, V.M. Montagu and P. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature** 318: 624-629.

Stewart Jr, C. N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. **Plant Cell Rep**. 20: 376-382.

Sujatha, M. and M. Sailaja. 2005. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) *via Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Rep**. 23: 803-810.

Tian, L., V. Levee, R. Mentag, P.J. Charest and A. Sequin. 1999. *Green fluorescent protein* as a tool for monitoring transgene expression in forest tree species. **Tree Physiol**. 19: 541-546.

Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, M. Wang, S. Thornton and R. Brettell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **Plant J.** 11: 1369-1376.

Trick, H.N. and J.J. Finer. 1997. SAAT: sonication-assisted- *Agrobacterium*-mediated transformation. **Transgen. Res.** 6: 329-336.

Trifonova, A., S. Madsen and A. Oleses. 2001. *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and intrigation into barley under a range of *in vitro* culture conditions. **Plant Sci.** 162: 871-880.

Tsuyoshi, Y., M. Teraishi, K. Hattori and M. Ishimoto. 2001. Transformation azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens.* **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 64: 47-54.

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

Vasil, I.K. 1994. Molecular improvement of cereals. **Plant Mol. Biol. Rep**. 25: 925-957.

Voisey, C.R., D.W.R. White, B. Dudas, R.D. Appleby, P.M. Ealing and A.G. Scott. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. **Plant Cell Rep**. 13: 309-314.

Weber S., W. Friedt, N. Landes, J. Molinier, C. Himber, P. Rousselin, G. Hahne and R. Horn. 2003. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. **Plant Cell Rep**. 21: 475-482.

Wordragen, M.F.V. and H.J.M. Dons. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of recalcitrant crops. **Plant Mol. Biol. Rep.** 10: 12-36.

Wu, H., C. Sparks, B. Amoah and H.D. Jones. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. **Plant Cell Rep**. 21: 659-668.

Yan, B., M.S.S. Reddy, G.B. Collins and R.D. Dinkins. 2000. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) using immature zygotic cotyledon explant. **Plant Cell Rep**. 19: 1090-1097.

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

Yookongkaew, N., M. Srivatanakul and J. Narangajavana. 2007. Development of genotype-independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. *indica*). **Plant Res.** 120: 237-245.

Zhang, S., L.H. Zhu, X.Y. Li, A. Ahlman and M. Welander. 2005. Infection by *Agrobacterium tumefaciens* increased the resistance of leaf explants to selection agents in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinesis*). **Plant Sci**. 168: 137-144.

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

Zhong, H., B. Sun, D. Warkentin, S. Zhang, R. Wu, T. Wu and M.B. Sticklen. 1996. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. **Plant Physiol**. 110: 1097-1107.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร สูตรสารเคมีและส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

ตารางผนวกที่ ก1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

ธาตุอาหาร	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutriens	
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000
KH_2PO_4	170.000
Micronutriens	
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.H_2O$	22.300
$ZnSO_4.7H_2O$	10.930
KI	0.830
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Fe-EDTA solution	
Na_2-EDTA	37.250
$FeSO_4.7H_20$	27.850
Organic compounds	
Glycine	2.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine.HCl	0.500
Thiamine.HCl	0.100
Myo-inositol	100.000
Other	
Sucrose	30,000.000
pH 5.70-5.80	

ตารางผนวกที่ ก2 องค์ประกอบของอาหาร Luria-Bertani Media (LB) (Maniatis *et al.*, 1982) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens*

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

ตารางผนวกที่ ก3 องค์ประกอบของอาหาร SOB (Maniatis *et al.*, 1982) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับทำ competent cell ของ *E. coli* และเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens*

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

ตารางผนวกที่ ก4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS Histochemical assay (Jefferson *et al.*, 1987)

เตรียมสารละลาย X-Gluc substrate โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) (บริษัท Fermentas) ปริมาณ 0.1044 กรัม ละลายในสารละลาย dimethylformamide ปริมาตร 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) นำสารละลายดังกล่าวมาผสมรวมกัน เขย่าส่วนผสมนี้ให้เข้ากัน แล้วนำเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบมาบ่มร่วมกับสารละลายดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วดูดสารละลายทิ้งเติมเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเปลี่ยนเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ใหม่ทุกๆ 2 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกว่าเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการตรวจสอบจะไม่มีสีเขียว แล้วนำเนื้อเยื่อไปตรวจสอบการเกิดจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลาย	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.0 M Na_2HPO_4 (pH 7.0)	0.1 M	100.0
5.0 mM $K_3Fe(CN)_6$	0.5 mM	100.0
5.0 mM $K_4Fe(CN)_6$	0.5 mM	100.0
0.25 M Na_2EDTA (pH 7.0)	10 mM	40.0
0.02 M X-gluc substrate	1.0 mM	50.0
10% Trion X-100	1.0%	10.0
dH_2O		600.0

ตารางผนวกที่ ก5 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมของพืชโดยดัดแปลงจากวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990)

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

ตารางผนวกที่ ก6 การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

6.1 ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *β-glucuronidase* (*gus*) (1X/20 µl)

ความเข้มข้นของสารประกอบปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10 X PCR buffer	1 X	2.0
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.0
1 mM dNTP mix	250 µM	5.0
5 µM Primer GUS456-F	0.125 µM	0.5
5 µM Primer GUS1375-R	0.125 µM	0.5
5U/ µl *Taq* polymerase	0.5U	0.1
50-100 ng DNA template		2.0
dH_2O		7.9
Total volume		20

6.2 ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) (1X/20 µl)

ความเข้มข้นของสารประกอบปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10 X PCR buffer	1 X	2.0
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.0
1 mM dNTP mix	250 µM	5.0
5 µM Primer HPT 2-F	0.125 µM	0.5
5 µM Primer HPT 5-RV	0.125 µM	0.5
5U/ µl *Taq* polymerase	0.5U	0.1
50-100 ng DNA template		2.0
dH_2O		7.9
Total volume		20

6.3 ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ของยีน *green fluorescent protein* (*mgfp5*) (1X/20 µl)

ความเข้มข้นของสารประกอบปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10 X PCR buffer	1 X	2.0
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.0
1 mM dNTP mix	250 µM	5.0
5 µM Primer mgfp5-F	0.125 µM	0.5
5 µM Primer mgfp5-R	0.125 µM	0.5
5U/ µl *Taq* polymerase	0.5U	0.1
50-100 ng DNA template		2.0
dH_2O		7.9
Total volume		20

6.4 การทำปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermocycler (Biometra®) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

gus/hpt

	96 °C	2 นาที	
Denaturing	96 °C	20 วินาที	30 รอบ
Annealing	55 °C	1 นาที	
Extention	72 °C	2 นาที	
	72 °C	5 นาที	
	16 °C	∞	

mgfp5

	94 °C	2 นาที	
Denaturing	94 °C	15 วินาที	50 รอบ
Annealing	65 °C	30 วินาที	
Extention	72 °C	30 วินาที	
	72 °C	5 นาที	
	16 °C	∞	

ตารางผนวกที่ ก7 การเตรียมส่วนผสมสำหรับทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR

7.1 ส่วนผสมสำหรับการทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ของยีน *gus*

ความเข้มข้นของสารประกอบปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (1X/50 µl)
10 X PCR buffer	1 X	5.0 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5.0 µl
10 X PCR DIG label	1 X	5.0 µl
5 µM Primer GUS456-F	0.125 µM	1.25 µl
5 µM Primer GUS1375-R	0.125 µM	1.25 µl
5U/ µl *Taq* polymerase	0.5U	5 µl
10 ng DNA template	200 pg	2.0 µl
dH_2O		25.5 µl
Total volume		50 µl

7.2 ส่วนผสมสำหรับการทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ของยีน *hpt*

ความเข้มข้นของสารประกอบปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (1X/50 µl)
10 X PCR buffer	1 X	5.0 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5.0 µl
10 X PCR DIG label	1 X	5.0 µl
5 µM Primer HPT 2-F	0.125 µM	1.25 µl
5 µM Primer HPT 5-RV	0.125 µM	1.25 µl
5U/ µl *Taq* polymerase	0.5U	5 µl
10 ng DNA template	200 pg	2.0 µl
dH_2O		25.5 µl
Total volume		50 µl

7.3 ส่วนผสมสำหรับการทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ของยีน *mgfp5*

ความเข้มข้นของสารประกอบปฏิกิริยา PCR	ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ	ปริมาตรที่ใช้ (1X/50 µl))
10 X PCR buffer	1 X	5.0 µl
50 mM $MgCl_2$	2.5 mM	5.0 µl
10 X PCR DIG label	1 X	5.0 µl
5 µM Primer mgfp5-F	0.125 µM	1.25 µl
5 µM Primer mgfp5-R	0.125 µM	1.25 µl
5U/ µl *Taq* polymerase	0.5U	5 µl
10 ng DNA template	200 pg	2.0 µl
dH_2O		25.5 µl
Total volume		50 µl

7.4 การทำดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมต่างๆ ใส่เครื่อง Thermocycler (Biometra®) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

gus/hpt

	96 °C	2 นาที	
Denaturing	96 °C	20 วินาที	30 รอบ
Annealing	55 °C	1 นาที	
Extention	72 °C	2 นาที	
	72 °C	5 นาที	
	16 °C	∞	

mgfp5

	94 °C	2 นาที	
Denaturing	94 °C	15 วินาที	50 รอบ
Annealing	65 °C	30 วินาที	
Extention	72 °C	2 นาที	
	72 °C	5 นาที	
	16 °C	∞	

ตารางผนวกที่ ก8 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ
Hybridization buffer	
SSC	5X
N-lauroylsarcosine	0.1%
SDS	0.02%
Blocking solution	1X
(1:10 dilution of stock 10X blocking solution)	
Low stringency buffer	
SSC	2x
SDS	0.1%
high stringency buffer	
SSC	0.1x
SDS	0.1%
Washing buffer	
Maleic acid buffer	1x
Tween 20	0.3%
Maleic acid buffer	
Maleic acid	0.1 M
NaCl	0.15 M
pH 7.5 (Adjusted with NaOH)	
Blocking solution	
Dilute 10X blocking solution 1:10 with Maleic acid buffer	
Detection buffer	
Tris-HCl	0.1 M
NaCl	0.1 M
pH 9.5 (Adjusted with NaOH)	

ตารางผนวกที่ ก9 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ Southern hybridization

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ
Depurination solution	
HCl	250 mM
Denaturation solution	
NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M
Neutralization solution	
NaCl	1.5 M
Tris-HCl, pH 8.0	0.5 M
pH 7.5	
Hybridization buffer	
SSC	5X
N-lauroylsarcosine	0.1%
SDS	0.02%
Blocking solution	1X
(1:10 dilution of stock 10X blocking solution)	
Low stringency buffer	
SSC	2x
SDS	0.1%
high stringency buffer	
SSC	0.1x
SDS	0.1%
Washing buffer	
Maleic acid buffer	1x
Tween 20	0.3%

ตารางผนวกที่ ก9 (ต่อ)

Maleic acid buffer	
Maleic acid	0.1 M
NaCl	0.15 M
pH 7.5 (Adjusted with NaOH)	
Blocking solution	
Dilute 10X blocking solution 1:10 with Maleic acid buffer	
Detection buffer	
Tris-HCl	0.2 M
NaCl	0.2 M
pH 9.5 (Adjusted with NaOH)	

ภาคผนวก ข
การเตรียมพลาสมิดและเชื้อแบคทีเรีย

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

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ในอาหาร LB broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหาร LB broth ทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 (Resuspension buffer : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RnaseA 100 μg/ml) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง แล้วย้ายเซลล์แขวนลอยเชื้อลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ P2 (Lysis buffer : 200 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ N3 (Nutralization buffer : 3 M potassium acetate, pH 5.5) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4-6 ครั้ง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายส่วนใสด้านบนลงใน QIAprep spin column จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB (Equilibration buffer : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanal, 0.15% TritonX-100) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที นำส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE (1 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanal) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง เพื่อล้าง QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด ย้าย QIAprep spin column วางลงบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ EB (10 mM Tris-HCl pH 8.0) หรือน้ำ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ได้พลาสมิดในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ด้านล่าง

2. การเตรียม competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ในอาหาร SOB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อมา 400 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำเซลล์แขวนลอยเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ประมาณ 0.2-0.4 นำเซลล์แขวนลอยเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เย็น แล้วแช่หลอดในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อเบาๆ ด้วยสารละลาย RF1 (10 mM KCl 50 mM $MnCl_2.4H_20$ 30 mM potassium acetate 10 mM $CaCl_2$ 15% glycerol และปรับ pH 5.8) ปริมาตร 1/3 เท่าของปริมาตรอาหาร SOB แล้วแช่หลอดในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อเบาๆ ด้วยสารละลาย RF2 (10 mM MOPS 10mM KCl 75 mM $CaCl_2$ 15% glycerol และปรับ pH 6.8) ปริมาตร 1/25 เท่าของปริมาตรอาหาร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เย็น หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-6 ชั่วโมงก่อนใช้ ส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ในการเตรียม competent cell ต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)

3. การเตรียม competent cell ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ AGL-1

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งสูตร LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตรโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ดูดเชื้อปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารแขวนลอยเชื้อแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วแบ่งสารแขวนลอยเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด ละลายตะกอนเชื้อเบาๆ ด้วยสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรหลอดละ 25 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด หลังจากนั้นละลายตะกอนเชื้อเบา ๆ ด้วยสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยลดปริมาตรลงหลอดละ 12.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งเหลือแต่ตะกอนเชื้อที่รวมกันอยู่ก้นหลอด ทำเช่นเดียวกันอีกครั้งตามข้อ 4.6 โดยลดปริมาตรของสารละลายกลีเซอรอลที่ใช้ละลายตะกอนเชื้อให้เหลือเพียงหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และแช่เย็น แบ่งใสหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการถ่ายยีนโดยวิธี electroporation ต่อไป

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวนุชจรี ทัดเศษ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	1 พฤศจิกายน 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดเลย
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2548 สาขาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ