

## แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลงานวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. ชุดโครงการ แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. โครงการวิจัย การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลองย่อย (ภาษาไทย) การถ่ายยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลและการตรวจสอบการปรากฏของยีนในพืชต้นแบบ
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Transformation and Detection Sucrose Synthase Gene in Model Plants

#### 4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางภุมรินทร์ วนิชชนานันท์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

## บทคัดย่อ

การถ่ายยีน Sucrose Synthase ลงในพืชต้นแบบ โดยศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Leaf disc โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 นำชิ้นส่วนใบมะเขือเทศมาทดสอบบนสูตรอาหาร จำนวน 11 สูตร ประกอบด้วย สูตรอาหาร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเกิดยอดใหม่ของสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ยอด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถเกิดรากเฉลี่ย 1.4 ราก เมื่อตัดแยกต้นเดี่ยวสามารถเจริญเติบโตและมีรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ สำหรับขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* พบว่าค่า OD<sub>600</sub> ที่เหมาะสมจะเท่ากับ 0.6 และปริมาตรเชื้อ 10 มิลลิตรจะเป็นปริมาตรที่มีความเข้มข้นของเชื้อเหมาะสมในการถ่ายยีน โดยใช้ระยะเวลาการแช่ชิ้นส่วนใบนาน 10 นาที สูตรอาหารเพื่อการคัดเลือกที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้อจากเนื้อเยื่อของพืชและมีผลยับยั้งการเกิดยอดใหม่

คำสำคัญ : เชื้ออะโกรแบคทีเรีย, สารปฏิชีวนะ, มะเขือเทศ

## ABSTRACT

Study on medium for induced shoot form tomato leaf using leaf disc technique by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105. Tomato leaf were cultured on MS medium containing 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/L BA and 0.1 or 0.2 mg/L IAA. The result showed that the new shoot can growth form MS medium supplemented with 2.5 mg/L BA and 0.1 mg/L IAA. The medium is the best for induced new shoot is 4.6 shoot and number of new root 1.4 root. Preparation of *A. tumefaciens* was optimize OD<sub>600</sub> = 0.6 by using 10 volume and 10 min treated explants. The result showed that selection medium with 50 mg/L Kanamycin and 100 mg/L Carbenicillin could not eliminate *A. tumefaciens* from the explants. In contrast, this selection medium prevented shoot induction.

Keyword : *Agrobacterium tumefaciens*, Kanamycin, Carbenicillin, Tomato

## คำนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญมากต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปีการผลิต 2556/57 ผลิตอ้อยได้สูงถึง 103.67 ล้านตัน ผลิตเป็นน้ำตาลได้ประมาณ 11.29 ล้านตัน ในจำนวนนี้ใช้บริโภคภายในประเทศ 2.5 ล้านตัน ส่วนที่เหลือส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ สร้างมูลค่ารวมได้ประมาณ 180,000 ล้านบาท ซึ่งหากรวมรายได้จากการแปรรูปเป็นอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่นๆ ได้แก่ การผลิตเอทานอล สุรา ซอส ซีอิ๊ว ผงชูรส อาหารสัตว์ ไม้อัด กระดาษ ปุ๋ยอินทรีย์ และเชื้อเพลิงผลิตไฟฟ้าแล้ว สามารถสร้างรายได้เพิ่มอีกนับแสนล้านบาท ในปีการผลิต 2557/58 มีพื้นที่เพาะปลูกอ้อยในเขตพื้นที่สำรวจรวม 47 จังหวัด จำนวน 10,530,927 ไร่ แบ่งเป็นพื้นที่ปลูกอ้อยส่งโรงงาน 9,591,448 ไร่ และพื้นที่ปลูกอ้อยทำพันธุ์ 939,479 ไร่ โดยมีพื้นที่เพิ่มขึ้นจากปี การผลิต 2556/57 จำนวน 455,784 ไร่ หรือร้อยละ 4.52 สำหรับการซื้อขายอ้อยตามค่าความหวานเริ่มใช้ตั้งแต่ฤดูกาลผลิตปี 2535/36 เป็นต้นมา โดยกำหนดให้ซื้อขายอ้อยตามคุณภาพความหวานวัดเป็น ซี.ซี.เอส. (Commercial Cane Sugar : C.C.S.) ซึ่งหมายความว่า ราคาอ้อยจะผันแปรไปตามคุณภาพหรือความหวาน ดังนั้นหากอ้อยมีความหวานมาก คือ มีค่า ซี.ซี.เอส. สูง ชาวไร้อ้อยจะรับราคาอ้อยสูงขึ้นด้วย

อ้อย เป็นพืช C4 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อยให้ได้ น้ำตาลซูโครส จะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์สองชนิดมาช่วยเร่ง คือ Sucrose Phosphate Synthase (SPS) และ Sucrose Synthase (SS) ซึ่งพบว่า Sucrose Synthase เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส โดยเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต การย่อยสลายซูโครสให้อยู่ในรูปของน้ำตาล hexoses และการเคลื่อนย้ายของน้ำตาล กระตุ้นให้มีการเปลี่ยนของน้ำตาลซูโครส และ UDP ไปเป็น UDP-glucose และ fructose ได้

ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ มีการศึกษาการทำงานของยีน โดยค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต่างๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแป้ง น้ำตาล และต้านทานโรคแมลงที่สำคัญในส่วนต่างๆ ของอ้อย เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณภาพและเพิ่มผลผลิต หากสามารถโคลนยีน Sucrose Synthase ได้ และนำยีนที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์อ้อยให้มีผลผลิตและค่าความหวานที่สูงขึ้น หรือนำไปถ่ายฝากลงในพืชที่มีการสร้างน้ำตาลได้น้อย เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตน้ำตาลให้มากขึ้นได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสลงในพืชต้นแบบ เพื่อการเพิ่มศักยภาพการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้นและพัฒนาต่อไปในพันธุ์อ้อยในอนาคต

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (พีเรเดซ, 2537)

ออกซิน (auxin) มีหน้าที่ควบคุมการขยายตัวของเซลล์ การเติบโตของใบ การติดผล การเกิดราก และเกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่นๆ อีกมากมาย IAA (indol-3-yl acetic acid) เป็นสารออกซินชนิดแรกที่ค้นพบ ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเอง โดยมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยึดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก

ไซโตไคนิน (Cytokinins) สารสังเคราะห์ในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ ไคเนติน (kinetin) BAP (6-benzylaminopurine) สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และกระตุ้นการเจริญทางด้านลำต้นของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง และยังมีผลเล็กน้อยต่อการพัฒนาของผล ใช้กันมากในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อกระตุ้นการเจริญของก้อนแคลลัส (callus) ให้เติบโตขึ้นเป็นลำต้น

อัญญา (2544) ได้ศึกษาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ 2 พันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 โดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS-B5 ที่เติม BA ร่วมกับ IAA (BA/IAA) ในอัตรา 1.0/0.2 และ 2.5/0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงชิ้นใบในที่ที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำการเกิดยอดได้ในอัตรา 50.0 และ 60.0% ตามลำดับ

#### การกำจัดเชื้อโดยใช้สารปฏิชีวนะ

การถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium* จำเป็นต้องใช้สารปฏิชีวนะในการกำจัดแบคทีเรียพาหะเมื่อเสร็จสิ้นการถ่ายยีนแล้วสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ ได้แก่ carbenicillin, cefotaxime, penicillin G และ paromomycin มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารปฏิชีวนะเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยการยับยั้งการเกิด cross-link ของ peptidoglycan โดยการเข้าไปเกาะและขัดขวางการสร้างเอนไซม์ในการสร้างผนังเซลล์ จึงมีผลทำให้เซลล์แตก (Ling และคณะ, 1998) เนื่องจากสารปฏิชีวนะดังกล่าวเข้าจับกับ penicillin binding protein (PBP-3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ inner membrane ใช้ในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากชนิดกว่าและยังมีฤทธิ์ทางเภสัชสูงกว่า carbenicillin (Mathais และ Boyd, 1986)

นอกจากนี้ carbenicillin และ penicillin G ยังมีโครงสร้างคล้าย auxin เมื่อแตกตัวจะให้สาร phenylacetic acid ซึ่งมีลักษณะคล้ายฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดยอด (Halford และ Newbury, 1992) อย่างไรก็ตามแม้สารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด จะมีการแตกตัวให้สารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ก็มีผลต่อการพัฒนาการเกิดเป็นยอดที่สมบูรณ์และลดอัตราการเกิดยอดของพืช เนื่องจากสารที่แตกตัวนั้นทำให้สมดุลของสัดส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin ในพืชเปลี่ยนไป (Nauerby และคณะ, 1997; Ling และคณะ, 1998)

#### **วัตถุประสงค์**

ศึกษาสูตรการที่เหมาะสมในการชักนำต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Leaf disc โดยใช้

*Agrobacterium tumefaciens*

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดา
2. อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS)(1962), Phytigel, น้ำตาล sucrose
3. อาหารสังเคราะห์สูตร Luria-Bertani broth และ Luria-Bertani Agar
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 6-Benzylaminopurine (BA), Indole-3-acetic acid (IAA)
5. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forceps), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish), หลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร
6. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

### วิธีการ

#### 1. การทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบมะเขือเทศ

เตรียมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาฟอกฆ่าเชื้อตามขั้นตอนดังนี้

- 1) นำเมล็ดมะเขือเทศมาล้างด้วยน้ำผสมน้ำยาล้างจานให้สะอาด
- 2) แช่เมล็ดมะเขือเทศในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
- 3) นำเมล็ดมะเขือเทศมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) Haiter<sup>®</sup> ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 20 นาที
- 4) ล้างด้วยน้ำสะอาดนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง
- 5) นำเมล็ดมะเขือเทศมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS จำนวน 10 เมล็ดต่อขวด

ตัดชิ้นส่วนใบมะเขือเทศให้มีเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาทดสอบการเกิดยอด และรากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mg/l ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mg/l รวม 11 กรรมวิธี ดังนี้

- 1) MS (Control)
- 2) MS + BA 1 mg/l + IAA 0.1 mg/l
- 3) MS + BA 1 mg/l + IAA 0.2 mg/l
- 4) MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l
- 5) MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l
- 6) MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l
- 7) MS + BA 2 mg/l + IAA 0.2 mg/l
- 8) MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l
- 9) MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l
- 10) MS + BA 3 mg/l + IAA 0.1 mg/l
- 11) MS + BA 3 mg/l + IAA 0.2 mg/l

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 11 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 10 ซ้ำ

บันทึกจำนวนยอดและจำนวนราก

## 2. เตรียมอะโกรแบคทีเรีย และทดสอบความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ใช้ในการถ่ายยีน

นำเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มียีนเป้าหมาย Sucrose Synthase (SuSy) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

นำมาวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.6-0.8 จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 5 หรือ 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมน้ำอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์

### การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ โดยวิธี leaf disc

ตัดชิ้นส่วนใบมะเขือเทศให้มีเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาแช่ในสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 2 นาน 5 หรือ 10 นาที ซับชิ้นส่วนใบบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วย้ายชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหารสูตรที่คัดเลือกจากข้อ 1 ที่เติม Kanamycin 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะคัดเลือก Carbennicillin 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกต้นที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก Carbennicillin มาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่มีสารปฏิชีวนะให้เจริญเติบโต โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ นำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR

## 3. ตรวจสอบการปรากฏของยีนในมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SuSy โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*

### เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง

เดือนตุลาคม 2557 – เดือนกันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบมะเขือเทศ

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์สีดามาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ใช้ระยะเวลา 7-10 วัน จะเกิดต้นมะเขือเทศ จากนั้นนำชิ้นส่วนใบมะเขือเทศมาทดสอบบนสูตรอาหารเพื่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวน 11 สูตร ประกอบด้วย สูตรอาหาร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเกิดยอดใหม่ของสูตรอาหารร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ยอด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถเกิดรากเฉลี่ย 1.4 ราก เมื่อตัดแยกต้นเดี่ยวสามารถเจริญเติบโตและมีรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 1) ในขณะที่สูตรอาหาร MS (control) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดรากสูงสุด 2.6 ราก (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับการรายงานของ อัญญา (2544) ได้ศึกษาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ 2 พันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 โดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS-B5 ที่เติม BA ร่วมกับ IAA (BA/IAA) ในอัตรา 1.0/0.2 และ 2.5/0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงขึ้นใบในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำการเกิดยอดได้ในอัตรา 50.0 และ 60.0% ตามลำดับ












ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนยอดและจำนวนรากที่เกิดจากชิ้นส่วนใบมะเขือเทศ เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	ค่าเฉลี่ย	
	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนราก (ราก)
MS (Control)	3.2 ab <sup>1/</sup>	2.6 a
MS + BA 1 mg/l + IAA 0.1 mg/l	1.8 b	1.0 bcd
MS + BA 1 mg/l + IAA 0.2 mg/l	1 b	0.4 cd
MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l	1.6 b	0 d
MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l	1.6 b	0 d
MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l	4.4 a	0.4 cd
MS + BA 2 mg/l + IAA 0.2 mg/l	2.6 ab	0.6 cd
MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l	4.6 a	1.4 bc
MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l	2.8 ab	1.2 bcd
MS + BA 3 mg/l + IAA 0.1 mg/l	3.2 ab	2.0 ab
MS + BA 3 mg/l + IAA 0.2 mg/l	3.2 ab	0.8 cd
F-test	*	**
c.v.(%)	57.97	89.63

\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

\*\* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

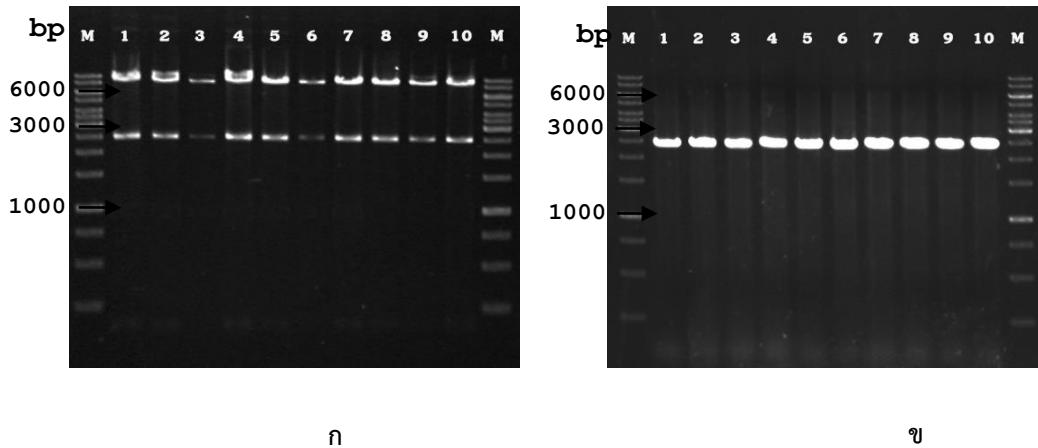
			
MS (Control)	MS+BA 1 mg/L + IAA 0.1 mg/L	MS+BA 1 mg/L + IAA 0.2 mg/L	MS+BA 1.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L
			
MS+BA 1.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L	MS+BA 2 mg/L + IAA 0.1 mg/L	MS+BA 2 mg/L + IAA 0.2 mg/L	MS+BA 2.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L
			
MS+BA 2.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L	MS+BA 3 mg/L + IAA 0.1 mg/L	MS+BA 3 mg/L + IAA 0.2 mg/L	

ภาพที่ 1 การเกิดยอดและรากของต้นมะเขือเทศ เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

## 2. เตรียมอะโกรแบคทีเรีย และทดสอบความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ใช้ในการถ่ายยีน

จากการรายงานของ สุภาวดี (2556) ที่ทำการโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล ได้ทำการโคลนยีนและเชื่อมต่อชิ้นยีน Sucrose Synthase ขนาด 2376 คู่เบสเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ขนาด 9640 คู่เบส และทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน (ภาพที่ 2) นำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน Susy เข้าสู่เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกเซลล์ของ *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมที่มียีน Susy บนอาหารแข็งสูตร LB ที่ผสม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำเป็น mater plate เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช





- ภาพที่ 2 ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300-SuSy ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโคลนที่ 1-10 ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*
- ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 - SuSy โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR โคลนที่ 1 - 10

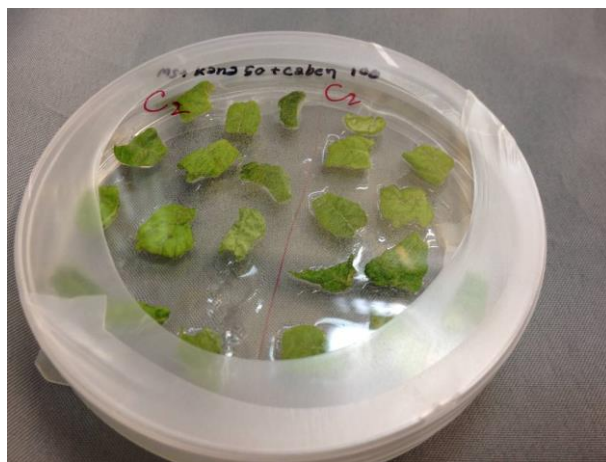
#### การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ โดยวิธี leaf disc

นำเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีนเป้าหมาย Sucrose Synthase (SuSy) ซึ่งได้เตรียม เป็น master plate มาเลี้ยงทำการ streak เพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนี เดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

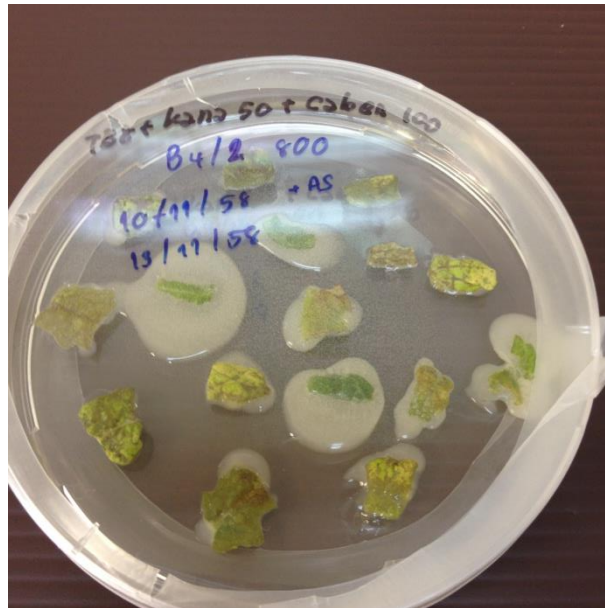
นำมาวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.6-0.8 โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 4-6 ชั่วโมง พบว่า ในการทดลองค่าที่เหมาะสมจะเท่ากับ 0.6 และจากทดสอบนำเชื้อ ปริมาตร 5 หรือ 10 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจะเป็นปริมาตรที่เหมาะสมมีปริมาณของเซลล์ที่ เพียงพอ เมื่อนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมน้ำอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรีย ในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetylsyringone 200 ไมโคร โมลาร์ ช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพของ *Agrobacterium* ในการนำยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

จากนั้นเตรียมชิ้นส่วนใบมะเขือเทศให้มีเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาแช่ใน สารละลายที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* จากการทดสอบระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนใบลงในสารละลาย ที่มี เซลล์ พบว่า การแช่ชิ้นใบนาน 10 นาทีจะทำให้ประสิทธิภาพการเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อพืชของ *A. tumefaciens*

เกิดขึ้นได้ดีกว่า การแช่นาน 5 นาที นำชิ้นใบขึ้นมาซับเซลล์แบคทีเรียออกบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหาร Co-cultivation สูตร MS ร่วมกับ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3) พบว่า เชื้อ *A. tumefaciens* ที่เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชมีปริมาณมากและสารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้อจากเนื้อเยื่อของพืชได้ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจะทำให้เนื้อเยื่อใบมะเขือเทศไม่สามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสซึ่งจะพัฒนาต่อเป็นยอดใหม่ได้ โดยใบมะเขือเทศจะมีลักษณะใบเป็นสีเหลือง หรือบางชิ้นใบจะมีเชื้อ *A. tumefaciens* เกิดขึ้นรอบๆ บริเวณใบมะเขือเทศ (ภาพที่ 4) Sheila (1991) ได้รายงานว่าการถ่ายยีนในมะเขือเทศ จะทำได้ยากกว่าการถ่ายยีนในพืชชนิดอื่นๆ เช่น พืชุนี และ ยาสูบ ซึ่งจะมีอัตราความสำเร็จที่สูงกว่า รวมทั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น คือ สายพันธุ์ของเชื้อ *Agrobacterium*, ชนิดของสารปฏิชีวนะ และจากรายงานของ สุมณฑิพย์ และ เนริสา (1997) ได้ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) timentin, cefotaxime และ carbenicillin ต่ออัตราการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม พบว่า timentin และ cefotaxime มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่มที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ carbenicillin ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับความสามารถในการกำจัด *A. tumefaciens* strain EHA 105 และจากคุณสมบัติของ carbenicillin ที่มีการแตกตัวให้สารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ก็มีผลต่อการพัฒนาการเกิดเป็นยอดที่สมบูรณ์และลดอัตราการเกิดยอดของพืช เนื่องจากสารที่แตกตัวนั้นทำให้สมดุลของสัดส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin ในพืชเปลี่ยนไป (Nauerby และคณะ, 1997; Ling และคณะ, 1998)



ภาพที่ 3 การถ่ายยีน Sucrose synthase เข้าสู่ใบมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค leaf disc



ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนใบมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี leaf disc และมีการปนเปื้อนของเชื้อ *A. tumefaciens*

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เทคนิคการถ่ายยีนด้วยวิธี leaf disc โดย *Agrobacterium tumefaciens*. สายพันธุ์ EHA 105 ในขั้นตอนการเตรียมเชื้อควรวัดค่า OD<sub>600</sub> = 0.6 จะเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการนำเชื้อไปใช้ในการถ่ายยีน โดยใช้ปริมาตรของเชื้อ 10 มิลลิลิตร และใช้เวลาในการแช่ชิ้นส่วนใบ นาน 10 นาที
2. สูตรอาหารคัดเลือก ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens*. ไม่ควรเลือกใช้ carbenicillin เนื่องจากมีผลยับยั้งต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนใบพืช
3. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในมะเขือเทศพันธุ์สีดา ได้แก่ สูตรอาหาร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

## การนำผลงานวิจัยไปใช้

เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการถ่ายฝากยีนที่เป็นประโยชน์ทางด้านการเกษตรในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนเพื่อการเพิ่มผลผลิต เป็นต้น

### เอกสารอ้างอิง

- พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอริโมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 196 หน้า
- สุมนทิพย์ บุนนาค และ เนริสา คุณประทุม. 1997. อิทธิพลของ timentin, cefotaxime และ carbenicilline ต่ออัตราการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม และความสามารถในการกำจัด *Agrobacterium tumefaciens*. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 25 (3) : 201-207
- อัญญา บุญชด. 2544. การถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ cucumber mosaic virus เข้าสู่มะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 90 หน้า
- Holford, P and H.J. Newbury. 1992. The effect of antibiotic and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus*. Plant Cell Rep. 11: 93-96.
- Ling, H. Q., D. Kriseleit and M.W. Ganal. 1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plant Cell Rep. 17: 843-847.
- Mathias, R. Y. and L. A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L EM. Thell). Plant Science. 46 : 217-223.
- McCormick, S. 1991. Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual. B6: 1-9.