รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย : การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย: การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์

กิจกรรม: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายยีนในยางพารา

Hevea Tissue Culture and Genetic Transformation

การทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาการปลูกถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในยางพารา

(ภาษาอังกฤษ) : Genetic transformation technique development via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายวิทยา พรหมมี

ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

ผู้ร่วมงาน: ผศ.ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและภาควิชาพืชสวน

คณะเกษตรกำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน

บทคัดย่อ

การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด ยืนยันจากการตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี Gus histochemical assay โดยการนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน และจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นเนื้อเยื่อ และจากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตโดยการทำ PCR พบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกได้รับการถ่ายฝากยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อได้สำเร็จ ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ที่เหมาะสม คือ 3-5 วัน การกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* บนอาหารที่เติม Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถกำจัดเชื้อได้ดี ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำนำ

การปลูกถ่ายยีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่ไปในพืชเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ (Estruch et al., 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม ยีนที่ใส่ลงไปมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวๆที่รู้หน้าที่ของยีนที่ชัดเจน โดยทั่วไปลักษณะของยีนที่ใส่ลงไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พืชมีผลผลิตที่สูงขึ้นและเพิ่มลักษณะทนทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมตลอดจนปรับปรุงคุณภาพในองค์ประกอบของเมล็ด ในขณะที่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ นั้นเป็นการนำเอายีนจำนวนมากถึงหนึ่งพันยีน และเป็นยีนที่ไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจนใส่เข้าไปในพืชปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ในพืชหลายชนิด สำหรับการปลูกถ่ายยีนในยางพารา ปัจจุบันหลายประเทศได้มีการศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ยีนเครื่องหมายและยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร ตลอดจนต้นยางพาราที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส มาเลเซีย อินเดีย และจีน สำหรับในประเทศไทย กษิดิศ และคณะ (2544) ได้รายงานผลสำเร็จของการปลูกถ่ายยีน ในเมล็ดอ่อนยางพาราด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* และ Particle bombardment โดยใช้ยีนเครื่องหมาย ยีน *gus* แต่ยังไม่มีรายงานการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเข้าไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของระบบการปลูกถ่ายยีนในพืช ถึงแม้ว่าจะมีการปลูกถ่ายยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชแล้วก็ตามถ้าหากการเพาะเลี้ยงเนื้อยังไม่ประสพความสำเร็จ การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ในทำนองเดียวกันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสพความสำเร็จได้แต่ปราศจากความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีน ก็ไม่สามารถสร้างพืชตัดแต่งพันธุกรรมได้เช่นกัน โดยทั่วไปการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับเซลล์ร่างกายของพืช และสามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยผ่านกระบวนการ การสร้างอวัยวะ (organogenesis) และ การสร้างต้นอ่อน (somatic embryogenesis) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะต้องได้รับฮอร์โมน และธาตุอาหาร ที่เหมาะสม (Skoog and Miller, 1957) กระบวนการสร้างอวัยวะ เป็นการพัฒนาในส่วนของยอด โดยสามารถพัฒนาได้จากส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆ ยกเว้นในส่วนของใบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพราะพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีเนื้อเยื่อเมอริสเต็มเฉพาะในส่วนของโคนใบ (Maheshwari et al., 1995) ส่วนของใบเลี้ยง ชิ้นส่วนใบ ไฮโปคอทิล และ สแคเทลัมจากเอมไบรโอ มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยอดได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมนชักนำการสร้างยอด โดยปกติใช้ฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น 6-benzyl-aminopurineเช่นในใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (Zhang et al., 1999) กระบวนการสร้างต้นอ่อน เป็นการพัฒนาของต้นอ่อนจาก เซลล์ร่างกาย เช่น ต้นอ่อนจากเมล็ด สปอร์ และ ใบ ในบางครั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเกิดลักษณะฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นลักษณะผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อ เรียกว่า hyperhydricityซึ่งจะพบได้บ่อยในพืชไม้ยืนต้น แต่ลักษณะดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการดัดแปลงชนิดของน้ำตาล ปริมาณของแคลเซี่ยม หรือโดยการใช้ antivirifying agents เช่น phloridzin (Debergh et al., 1992) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในยางพารา มีการชักนำแคลลัสจากส่วนของลำต้นที่ผ่านการทำหนุ่มสาว รายงานครั้งแรกโดย Bouychou (1953) การพัฒนาของการเพาะเลี้ยงแคลลัสจาก cotyledon-like embryos รายงานครั้งแรกโดย Wilson and street (1975) ในขณะเดียวกัน Paranjothy and Ghandimathi (1975) สามารถชักนำเอมบริออยจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร แต่อย่างไรก็ตามการทดลองเหล่านี้ยังไม่มีรายงานประสพความสำเร็จในการพัฒนา

ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ จนกระทั่งมีรายงานประสพความสำเร็จของการพัฒนาต้นยางโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ของประเทศจีน โดย Chen et al. (1977) สำหรับสถาบันวิจัยยางมาเลเซียประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อยางเป็นครั้งแรกในต้นปี 1980 โดยได้ต้นยางพันธุ์ GT1จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสร (Wan et al., 1982) และในปี 1990 สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อน ในยางพันธุ์ RRIM600 (Hafsah and Wan, 1995) ที่ผ่านมาเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของผนังเซลล์อับละอองเกสร ในระยะต่อมาสถาบันวิจัยของฝรั่งเศส โดย Etienne et al., 1993; Carron et al., 1995) ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางโดยใช้ส่วนของเนื้อเยื่อชั้นในของเยื้อหุ้มเมล็ดอ่อน นอกจากนั้นยังมีการเพาะเลี้ยงโอวุล ซึ่งรายงานครั้งแรกโดย Guo et al. (1982) ในปี 1990 สถาบันวิจัยยางมาเลเซีย สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงโอวุล (Hafsah and Wan, 1995) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหล่านั้นได้มีการนำไปปลูกในแปลงได้สำเร็จ และมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราในประเทศไทยมีรายงานถึงความก้าวหน้าในระดับหนึ่ง โดยการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อน (กรรณิการ์ และคณะ, 2542; Te-chato and Chartikul, 1993; กษิดิศ และคณะ, 2544) เพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นของต้นกล้าและต้นพันธุ์ (ปัทมา และ ภัทราวุธ, 2535; อรุณี และสมปอง, 2535ก; อรุณี และสมปอง, 2535ข) เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (สมปอง และ วันทนา, 2531) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน การแยก และการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (พจมาลย์ และ สมปอง, 2542) อย่างไรก็ตามจากรายงานประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในประเทศไทยมีเพียง Te-chato and Chartikul, 1993 และ กรรณิการ์ และคณะ, 2542 เท่านั้นที่สามารถพัฒนาต้นพืชที่สมบูรณ์ได้จากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อนจากยางพันธุ์ TJIR1 และ BPM24, PB260, PB311, RRII105 และ RRIM600 ตามลำดับ กรรณิการ์ และคณะ, 2542 ได้นำยางพันธุ์ BPM24 ไปปลูกในสภาพแปลงปลูกพบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นยางที่ได้จากการติดตา

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ฟลาสก์ ขวดเก็บสารละลาย จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เครื่องชั่งละเอียด เครื่องชั่งแบบหยาบ เครื่องปรับความเป็นกรดด่าง เครื่องคนสารละลาย ไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน
3. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ฟอร์แซบ ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด ถาดใส่เครื่องมือ
4. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5. ชั้นวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมติดตั้งระบบไฟฟ้าและตัวควบคุมการปิดเปิดไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศพร้อมตัวควบคุมปิดเปิด

วิธีการ

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Agrobacterium* ที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน นำแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้น OD_{600} 0, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 โดยวิธีการจุ่มแช่ ระยะเวลา 3-5 นาที และเลี้ยงร่วมบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเปลี่ยนย้ายบนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก และนำแคลลัสและชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตจากการวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกไปตรวจสอบความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมแคลลัสด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

2. ศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมกับเชื้อ *Agrobacterium* นำแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้น OD_{600} ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 จุ่มแช่ ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 นาที และเลี้ยงร่วมบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม Cefotaximความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเปลี่ยนย้ายบนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก และนำแคลลัสและชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตจากการวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกไปตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมแคลลัสด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

3. ศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* นำแคลลัสที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* โดยวิธีการจุ่มแช่ที่ความเข้มข้น OD_{600} ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ระยะเวลาการจุ่มแช่และเลี้ยงร่วมบนอาหารตามระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 และวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อโดยการหยดเชื้อลงบนแคลลัส จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเปลี่ยนย้ายบนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกและนำแคลลัสและชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตจากการวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกไปตรวจสอบความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมแคลลัสด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

4. การพัฒนาต้นยางที่ปลูกถ่ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium* ผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อน แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* โดยวิธีการที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1-3 และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์โดยผ่านการสร้างต้นอ่อนและตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมจากต้นที่ได้ด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด ตุลาคม 2558

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

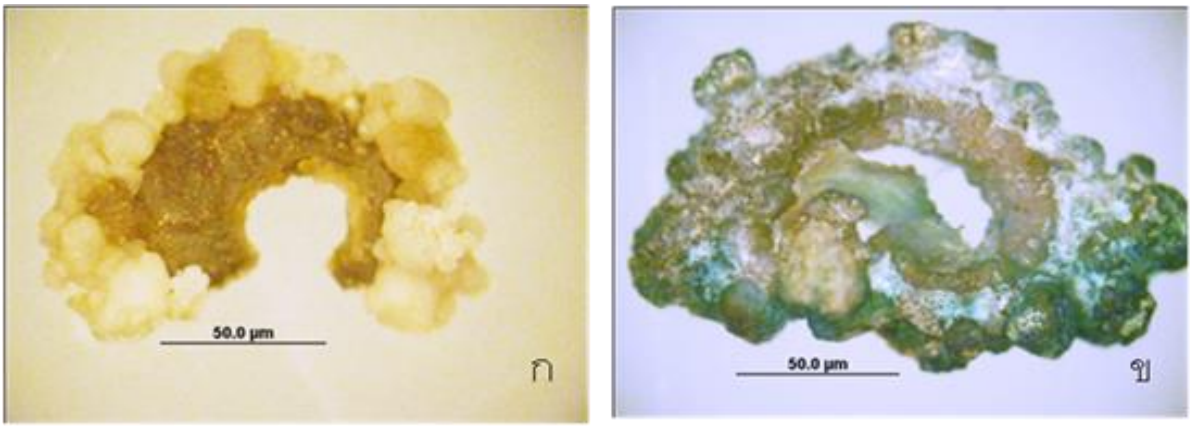
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

ทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *gus*เป็นยีนรายงานผลที่ระดับความเข้มของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.4, 0.6 และ 0.8 ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 1, 5, 10, 20, 40 และ 60 วินาที หลังจากการปลูกเชื้อนาน 1 สัปดาห์ นำเนื้อเยื่อมาตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี Gus histochemical assay โดยการนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน และจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นเนื้อเยื่อ พบว่า จากการคำนวณทางสถิติ ทุกสิ่งทดลองให้ผลไม่แตกต่างกัน (ภาพที่1) ซึ่งเมื่อนำข้อมูลทั้งสองชุดมาพิจารณา พบว่า สิ่งทดลองที่ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด คือ การใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที (ตารางที่ 1) และจากการศึกษาระบบการถ่ายฝากยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* กับแคลลัสยางพาราพันธุ์ BPM24, RRIM600 และ RRIT251 โดยใช้ยีนรายงานผล (*gus*) พบว่าสามารถถ่ายฝากยีน *gus*โดยใช้ *Agrobacterium* ทั้งสองสายพันธุ์ คือ EHA105 และ GL1 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วม 3-5 วัน

ตารางที่ 1 ผลของการแสดงออกของยีน *gus*แบบชั่วคราว (transient expression) บนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน โดยวิธี Gus histochemical assay

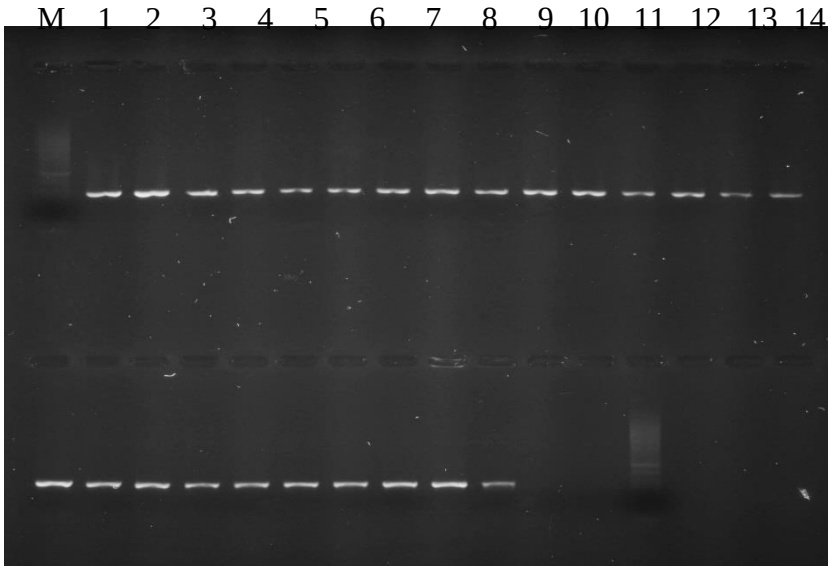
สิ่งทดลอง (ความเข้มข้น,ระยะเวลา (วินาที)	จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินเฉลี่ย	จำนวนจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อเฉลี่ย
ชุดเปรียบเทียบ	0	0
0.4,1	5.5	9.3
0.4,5	6.0	11.7
0.4,10	3.5	6.9
0.4,20	1.5	5.3
0.4,40	4.0	5.8
0.4,60	3.5	13.8
0.6,1	8.5	6.4
0.6,5	4.0	9.8
0.6,10	5.5	8.6
0.6,20	2.0	11.1
0.6,40	2.0	12.5
0.6,60	6.0	13.1
0.8,1	1.0	3.0
0.8,5	2.0	13.8
0.8,10	5.0	19.7
0.8,20	3.5	11.9
0.8,40	6.0	28.8
0.8,60	4.0	14.4



ภาพที่1 แสดงชิ้นส่วนแคลลัสยางพาราที่ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* tumefaciens (EHA105; Gus, Cocultivate 3-5 d.)**โดยวิธี** Gus histochemical assay: **ก : แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ข : แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน**

การตรวจสอบผลการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้ปฏิกิริยา PCR

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายฝากยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรกำจัดเชื้อ MH (IN) ที่เติม Cefotaximeความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรระยะเวลา 2 สัปดาห์ และอาหารสูตรคัดเลือก MH (IN) Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตโดยการทำ PCR พบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกได้รับการถ่ายฝากยีน *Gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อ (ภาพที่ 2)



M = 1 kb marker
1-23 = sample 1-23
P1-2 = positive control
N = negative control

ภาพที่ 2 ผลของปฏิกิริยาPCR ของเนื้อเยื่อยางพันธุ์RRIM600 ที่ถ่ายฝากยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* **ที่มียีน** *Gus*

ศึกษาผลความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

ทดสอบผลของ Cefotaximeที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 100, 200, 300 และ 400มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ GL1 โดยการสเปรชเชื้อบนอาหาร LB ที่เติม Cefotaxime ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า

ผลจากการสเปรชเชื้อ สายพันธุ์ EHA105 บนอาหาร LB ที่เติม Cefotaxime ความเข้มข้นต่างๆ กันพบว่า อาหารที่ไม่เติม Cefotaxime เชื้อเจริญขึ้นเต็ม plate ทุก plate ในขณะที่ อาหารที่เติม Cefotaxime100 มิลลิกรัมต่อลิตรพบเชื้อเจริญเฉลี่ย 1 colony/plate และ อาหารที่เติม Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่พบเชื้อเจริญขึ้น

ผลจากการสเปรชเชื้อสายพันธุ์ GL1 บนอาหาร LB ที่เติม Cefotaxime ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า อาหารที่ไม่เติม Cefotaxime เชื้อเจริญขึ้นเต็ม plate ทุก plate ในขณะที่ อาหารที่เติม Cefotaxime 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบเชื้อเจริญขึ้น

ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ Kanamycin ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสยางพารา

ตัดแคลลัสให้มีขนาดประมาณ 0.5ลูกบาศก์เซนติเมตร และเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MH (IN) ที่เติม Kanamycin ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้น จากผลการทดลอง ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการรอดชีวิตของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม kanamycin เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น Kanamycin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสรอดชีวิตเฉลี่ย (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
0	10	100
50	2.5	25
100	1.25	12.5
150	0	0
200	0	0

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *Gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด ยืนยันจากการตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบ

ชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี Gus histochemical assay โดยการนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินและจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นเนื้อเยื่อ และจากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตโดยการทำ PCR พบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกได้รับการถ่ายฝากยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อได้สำเร็จ นอกจากนั้นยังสามารถถ่ายฝากยีน โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ คือ GL1 ได้ โดยระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมทั้งสองสายพันธุ์ที่เหมาะสม คือ 3-5 วัน จากศึกษาผลความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า สายพันธุ์ EHA105 อาหารที่เติม Cefotaxime200-400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อได้ดี สายพันธุ์ GL1 อาหารที่เติม Cefotaxime100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อได้ดี จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ Kanamycin ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสยางพารา ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการพัฒนางานด้านยางพาราทั้งการขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการปรับปรุงการผลิตยางโดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพทั้งในปัจจุบันและในอนาคต โดยเฉพาะการพัฒนางานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ของยางพาราซึ่งจะต้องลงไปในเชิงลึก เช่น การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์ยาง การถ่ายฝากยีนในยางพาราเพื่อศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของยีน ตลอดจนการถ่ายฝากยีนเข้าไปในยางพาราเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยาง ดังนั้นผลงานวิจัยนี้ถือเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากสำหรับนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยเชิงลึกในการพัฒนางานวิจัยด้านยางพาราต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2545. ความก้าวหน้าทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา. ในรายงานการสัมมนาเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช 26-27 กรกฎาคม 2545. สถาบันวิจัยพืชสวนกรมวิชาการเกษตร. 67-79.

กษิดิส ดิษฐบรรจง จารุวรรณ จาติเสถียร และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2544. การใช้เมล็ดอ่อนยางพาราสำหรับการฝากถ่ายยีน. ในเทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิคกรมวิชาการเกษตร. 14-35.

กษิดิส ดิษฐบรรจง จารุวรรณ จาติเสถียร และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2544. การเพิ่มปริมาณ somatic embryo callusของยางพารา. ในเทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิคกรมวิชาการเกษตร. 36-51.

ปัทมา ชนะสงคราม และ ภัทราวุฒิ จิวตระกูล. 2534. การขยายพันธุ์ยางพาราด้วยเทคนิคไมโครคัตติ้งในหลอดทดลอง. วิทยาสาสตร์เกษตรศาสตร์ 25: 133-138.

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และ สมปอง เตชะโต. 2542. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันการแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 21: 169-177.

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้

ในยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 10: 1-6.
สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราI การขยายพันธุ์ยางโดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 14: 123-132.
สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ข. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราII เทคนิคการชักนำรากจากยางพาราในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 14: 133-139.
Bouychou, J. G. 1953. La culture *in vitro* des tissue D' *Hevea*. Proc. Rubb. Conf. Bogor, 1952. Arch.
Rubbercult, 30, 50-53.
Carron, M. P., Etienne, H., Larder, L., Campagna, S., Perrin, Y., Leconte, A. and Chaine, C. 1995.
Somatic embryogenesis in Rubber (*Hevae brasiliensis* Mull. Arg.) Somatic embryogenesis in
woody plants Vol.2, pp. 117-136.
Chen, C-H., Chen, F-T., Chien, C-F., Wang, C-H, Chang, S-C., Hsu, H-E, Ou, S-H., He, Y-T and Lu, T-M. 1979. A process of obtaining pollen plants of *Hevae brasiliensis*. Sci. Sinica, 22, 81-90.
Debergh, P. 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation, Plant Cell,
Tissue Organ Cult.30: 135–140.
Estruch, J. J. 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control, Nat. Biotechnol. 15: 137– 141.
Etienne, H., Chen, Z., Qian, C., Wang, C.C., He, Y. and Xiao, Y. 1981. Investigation of ploidy in the process of anther culture of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Acta Genet. Sin., 8, 169-174.
Guo, G., Jia, X. and Che, L. 1982. Induction of plantlets from ovules in vitro of *Hevea brasiliensis*.
Hereditas, 4(1), 27-28.
Hafsah Jaa Far and Wan Abdul Rahaman, W. Y. 1995. In vitro Technology of *Hevae*-Current Developments in the Rubber Research Institute of Malaysia.2 nd conference on Agricultural
biotechnology, 13-15 June, Jakarta.
Maheshwari, N. 1995. *In vitro* culture of wheat and genetic transformation retrospect and prospect, Crit.
Rev. Plant Sci. 14: 149–178.

Paranjothy, K. And Grandimathi, H. 1975. Proceedings of International Rubber Conference on Tissue and

Organ Culture of *Hevea*. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia. 59-83.

Te-chato, S. and Chartikul, M. 1993. Tissue culture of rubber: Induction cell suspension and embryogenic

suspension culture. Songklanakarin J. Sci. Technol. 15: 341-347.

Wan Abdul Rahaman, W. Y., Grandimathi, H., Othman, R. and Paranjothy, K. 1982.

Recent developments in tissue culture of *Hevea* tissue culture of economically important plants. Singapore: C.O.S.T.E.D.

Wilson, H. M. and Street, H. E. 1975. The growth anatomy and morphogenetic potential of callus from

Hevea brasiliensis. Ann. Bot. (London) 39, 671-682.

Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P. and Clemente, T. E. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in

Agrobacterium-mediated transformation of soybean. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.56: 37–46.