แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลงานวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. ชุดโครงการ แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

3. ชื่อการทดลองย่อย 2.3.2 (ภาษาไทย) การถ่ายฝากยีนเพื่อยับยั้งขบวนการสร้างลิกนินในพืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Transformation Gene Involved in Lignin Biosynthetic Pathway in Plants.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

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

บทคัดย่อ

การถ่ายฝากยีนเพื่อยับยั้งขบวนการสร้างลิกนินให้มีปริมาณลิกนินต่ำเพื่อการผลิตไบโอเอทานอล โดยศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบอ่อนของหญ้าเนเปียร์พันธุ์ปากช่อง 1 ให้เกิดแคลลัสและยอด นำมาทดสอบบนสูตรอาหาร จำนวน 9 สูตร ประกอบด้วย สูตรอาหาร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทุกสูตรอาหารประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 50 มิลลิลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มี น้ำมะพร้าวอ่อน 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิด compact callus สีขาว ที่สามารถนำไปใช้ในการถ่ายยีนได้ การเลือกใช้แคลลัสของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 มาถ่ายยีนโดยวิธี Leaf disc โดยใช้ *A. tumefaciens* ในขั้นตอนของอาหารสำหรับการคัดเลือกร่วมกับสารปฏิชีวนะที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้ และมีผลทำให้เนื้อเยื่อแคลลัสตาย เมื่อเปลี่ยนมาใช้ชิ้นส่วนใบยาสูบ อาหารสำหรับการคัดเลือกดังกล่าว สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดต้นใหม่ได้

คำสำคัญ : หญ้าเนเปียร์, สารปฏิชีวนะ, เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ABSTRACT

Transformation gene involved in lignin biosynthetic pathway for bioethanol . Study on medium for induced callus and shoot form young leaf Napier. They were cultured on MS medium containing 0.5 or 1 mg/L 2,4-D, 0.5 or 1 mg/L NAA and 0.5 or 1 mg/L BA all cultured adding 50 ml/L coconut water. The result showed that white compact callus and shoot can growth form MS medium supplemented with 50 ml/L coconut water, 0.5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA. Selection medium with 50 mg/L Kanamycin and 100 mg/L Cefotaxime for using leaf disc technique by *Agrobacterium tumefaciens*. in Napier callus could not eliminate *A. tumefaciens* from the callus and prevent shoot induction. In contrast this selection medium showed that could induced shoot form Tobacco leaf.

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

คำนำ

พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หลายๆประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อนในภาวะของภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงอย่างมาก ปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของโลกกำลังจะหมดลง แหล่งอาหารของโลกก็ลดลงเช่นเดียวกันเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกแบบทวีคูณในขณะที่ผลิตอาหารเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงเนื่องจากความแห้งแล้ง การใช้พื้นที่เพื่อการอยู่อาศัยมากขึ้นและภัยธรรมชาติต่างๆ จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะพัฒนาแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงเหลวจากแหล่งใหม่ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนธรรมชาติโดยไม่รบกวนพืชอาหาร

ในปี ค.ศ. 2010 ทุกประเทศทั่วโลกหันมาให้ความสนใจกับการใช้ประโยชน์จากชีวมวลซึ่งจะเน้นการผลิตด้วยวัตถุดิบที่เป็นลิกโนเซลลูโลสเป็นหลัก แม้ว่าการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะยังผลิตจากวัตถุดิบแป้งและน้ำตาล แต่เนื่องจากแป้งและน้ำตาลเป็นพืชอาหารอาจผลิตได้ไม่เพียงพอสำหรับการบริโภค จึงต้องใช้วัสดุอื่นทดแทน เช่นเดียวกับประเทศไทยซึ่งปัจจุบันกำลังประสบปัญหาแนวโน้มการใช้พลังงานที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และแหล่งพลังงานในประเทศมีอัตราการผลิตได้ไม่เพียงพอกับความต้องการในการใช้อุปโภคและบริโภคของประชากร ประกอบราคาน้ำมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในตลาดโลกมีราคาแพง และมีอยู่อย่างจำกัด จึงจำเป็นต้องมีมาตรการเร่งรัด และสนับสนุนให้มีการศึกษา ค้นคว้า หาแหล่งพลังงานทดแทนซึ่งจะนำมาซึ่งพลังงานทางเลือกใหม่มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด การนำชีวมวลมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเอทานอลเพื่อทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงอย่างน้ำมันปิโตรเลียม อาทิเช่น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และอุตสาหกรรม อาทิเช่น เปลือกหรือแกนสับปะรด ทลายปาล์ม น้ำกากส่าจากโรงงานสุรา เศษไม้ขี้เลื่อยจากโรงงานทำไม้ ของเสียจากโรงงานทำกระดาษ ของเหลือใช้หลังจากการเก็บเกี่ยว เช่น กากถั่วเหลือง ฟางข้าว รำข้าว ชานอ้อย ซังและเปลือกข้าวโพด ขี้เลื่อย เป็นต้น

หญ้าเนเปียร์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pennisetum purpurem* มีลักษณะเป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้ามีความสูง 3-4 เมตร แตกกอดี มีใบดำหนากว้างและไม่ทิ้งใบ ไม่ติดเมล็ด มีระบบรากที่แข็งแรก แตกรากขึ้นมาจนถึงข้อที่ 3-4 จากดิน องค์ประกอบของหญ้าประกอบด้วยโปรตีนหยาบ 18.46% โปรตีนละเอียด 16.68% ไขมัน 1.74% เถ้า 9.91% เยื่อใย 17.7% พลังงาน 3.54% เยื่อใยรวมทั้งหมด 25.26% ซึ่งเหมาะกับการนำมาเลี้ยงสัตว์ได้ดีเมื่อเทียบกับชนิดอื่น นอกจากนี้ยังเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15°C ขึ้นไป (อุณหภูมิเหมาะสม 25-35 °C) ปริมาณน้ำฝนต้อง 1,000 มม./ปี

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเนเปียร์ (Pradit และคณะ, 2006) ได้ศึกษาการผลิตหญ้าเนเปียร์แคระโดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา พบว่า เมื่อนำใบอ่อนของหญ้าเนเปียร์แคระมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 95 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสที่เกิดจะเป็นชนิด compact callus และเมื่อย้ายแคลลัส

มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ , NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ 58.8 เปอร์เซ็นต์

ปาริสัชชา (2547) รายงานการชักนำให้เนื้อเยื่อบริเวณตายอดของหญ้าเนเปียร์แคระเกิดยอดหลายยอดได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ปริมาณต่างๆ กัน พบว่า ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุด จึงเลือกเพาะเลี้ยงหญ้าเนเปียร์แคระในอาหารสูตรดังกล่าว เพื่อการผลิตเนื้อเยื่อพืชให้ได้พืชจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นสำหรับใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

Haydu and Vasil (1981) พบว่า การนำชิ้นส่วนใบของหญ้าเนเปียร์บนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติม 2,4-D และ NAA จะทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะสีขาวชนิด compact callus และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Wang and Vasil (1982) รายการการชักนำแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของหญ้าเนเปียร์ (Napier or Elephant Grass) โดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เกิด compact callus สีขาว และสามารถชักนำการเกิด somatic embryogenesis มากกว่า 70%

<u>การกำจัดเชื้อโดยใช้สารปฏิชีวนะ</u>

การถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium* จำเป็นต้องใช้สารปฏิชีวนะในการกาจัดแบคทีเรียพาหะเมื่อเสร็จสิ้นการถ่ายยีนแล้วสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ ได้ แก่ carbenicillin, cefotaxime, penicillin G และ paromomycin มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารปฏิชีวนะเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยการยับยั้งการเกิด cross-link ของ petidoglycan โดยการเข้าไปเกาะและขัดขวางการสร้างเอนไซม์ในการสร้างผนังเซลล์ จึงมีผลทำให้เซลล์แตก (Ling และคณะ, 1998) เนื่องจากสารปฏิชีวนะดังกล่าวเข้าจับกับ penicillin binding protein (PBP-3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ inner membrane ใช้ในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากชนิดกว่าและยังมีฤทธิ์ทางเภสัชสูงกว่า carbenicillin (Mathais และ Boyd, 1986)

<u>สารปฏิชีวนะ Cefotaxime</u>

cefotaxime เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins เริ่มมีการนามาใช้ในช่วง ค.ศ.1970 (Grady และคณะ, 1990) มักใช้ในการยับยั้งหรือกำจัดแบคทีเรียแกรมลบ มีความคงทนในเอนไซม์ B-lactamase แต่จะถูก hydrolysed ได้ง่ายโดยกลุ่มของ TEM enzyme (A. Kucer และคณะ, 1997) สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่น้อยมาก และยังพบว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส, การชักนำให้ เกิดคัพภะ และการพัฒนาเป็นยอดของข้าวสาลี (Mathais และ Boyd, 1986) จากรายงานของ Yu และคณะ ปี 2001 พบว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับ ความเข้มข้น 100–500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิด somatic embryogenesis ของ Dianthus การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้นระดับสูง มีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อพืชเช่นกัน โดย Yu และคณะ (2001) พบว่าการใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 375 – 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลอย่างมากในการยับยั้งการเติบโตของแคลลัสมะละกอ และการใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ในทุกระดับความเข้มข้นมีผลทำให้ร้อยละของการเกิด somatic embryo ลดลงเหลือ 86.4 เปอร์เซ็นต์และยังพบ somatic embryo ที่มีความผิดปกติในทุกระดับความ เข้มข้น

รายงานของ ฉัตรนภา (2544) ทำการทดลองกำจัดเชื้อ Agrobacterium โดยใช้ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีผลต่อการเกิดยอด โดยลักษณะยอดที่ได้จะสั้น ไม่มีการยืดยาวของยอด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน อาหารสูตรที่ไม่ใส่ cefotaxime

วัตถุประสงค์

ศึกษาเทคนิคการถ่ายฝากยีนเพื่อยับยั้งขบวนการสร้างลิกนินในพืชให้มีปริมาณลิกนินต่ำเหมาะสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. หญ้าเนเปียร์ พันธุ์ ปากช่อง 1 (*Pennisetum purpurem*)
2. อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS)(1962), Phytagel, น้ำตาล sucrose
3. อาหารสังเคราะห์สูตร Luria-Bertani broth และ Luria-Bertani Agar
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 6-Benzylaminopurine (BA), Indole-3-acetic acid (IAA), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)
5. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish), หลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร
6. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404
7. สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือก Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
8. สารปฏิชีวนะ Kanamycin, Cefotaxime

<u>วิธีการ</u>

1. การทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1

เตรียมชิ้นส่วนใบอ่อนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 มาฟอกฆ่าเชื้อตามขั้นตอนดังนี้

1) ตัดใบอ่อนของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1มาล้างทำความสะอาด โดยใช้น้ำยาล้าง Teepol ® ลอกกาบใบออกจนได้เนื้อเยื่อภายใน
2) นำใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) Haiter ® ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง
3) นำใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) Haiter ® ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง
4) ล้างด้วยน้ำสะอาดนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

ตัดชิ้นส่วนใบหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ขนาดยาว 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาทดสอบการเกิดแคลลัสและยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่

ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารประกอบด้วยน้ำมะพร้าวปริมาตร 50 มิลลิลิตร รวม 9 กรรมวิธี ดังนี้

1) MS (Control)
2) MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l
3) MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 1 mg/l
4) MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l +BA 0.5 mg/l
5) MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l +BA 1 mg/l
6) MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l
7) MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 1 mg/l
8) MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l +BA 0.5 mg/l
9) MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l +BA 1 mg/l

บันทึกผลการเกิดแคลลัสและยอด

2. การนำยีนเป้าหมายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียม *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation

นำ Competent cell ของ *A. tumefaciens* ปริมาตร 50 µl ใส่ใน cuvette ที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง เติม plasmid DNA ปริมาตร 1 µl จากนั้นตั้งค่าเครื่อง Electroporation ดังนี้

Cuvette gap	0.2	cm
Voltage	2.5	kV
Capacitor	25	µF
Resistor	400	Ω
Time constant	8-9	mSec

เมื่อทำการ pulse เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตรทันที นำไปเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อ *A. tumefaciens* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 µl ร่วมกับ X-gal ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20 µl เพื่อคัดเลือกโคโลนีของ *A. tumefaciens* ทีมี recombinant plasmid (pCAMBIA2300) ที่มียีน COMT หรือ CCOMT หรือ CAD หรือ 4CL ด้วยวิธี white blue colony screening เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-3 วัน

3. การถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธี leaf disc

นำเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มียีนเป้าหมาย จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน COMT (Caffeate-O-methyl-transferase), CCOMT (Caffeoyl coenzyme A O-methytransferase), CAD (Cinnamyl alcohol dehydrogenase) และยีน 4CL (4-Coumarate : coenzyme A ligase) 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 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์

ตัดชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 นำมาแช่ในสารละลายที่มีอะโกรแบคทีเรียม นาน 10 นาที ซับชิ้นส่วนใบบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วย้ายชิ้นส่วนแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหารสูตรที่คัดเลือกจากข้อ 1 ที่เติม Kanamycin 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะคัดเลือก Cefotaxime 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกต้นที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก Cefotaxime มาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่มีสารปฏิชีวนะให้เจริญเติบโต โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ นำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR

4. ตรวจสอบการปรากฏของยีนในมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบการปรากฏของยีน โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นหญ้าเนเปียร์ที่ได้รับการถ่ายยีนมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Bam*HI (4CL และ CCOMT) และ K*bal* + *Kpn*I (CAD และ COMT)

<u>เวลาและสถานที่</u>

<u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u> เดือนตุลาคม 2556 – เดือนกันยายน 2558

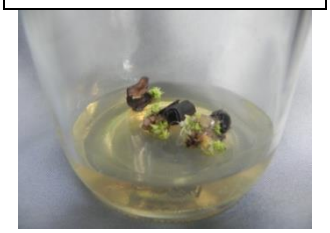
<u>สถานที่ทำการทดลอง</u> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาคารทรัพยากรพันธุกรมพืชสิรินธร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

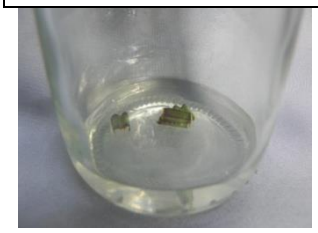
1. การทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1

ทดสอบการเกิดแคลลัสและยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารประกอบด้วยน้ำมะพร้าวปริมาตร 50 มิลลิลิตร รวม 9 สูตรอาหาร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีน้ำมะพร้าวอ่อน 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดแคลลัสร่วมกับการเกิดยอดจำนวนมาก (ภาพที่ 1) ลักษณะของแคลลัสที่ได้จะเป็น compact callus สีขาว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Haydu และ Vasil (1981) พบว่า การนำชิ้นส่วนใบของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 บนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติม 2,4-D และ NAA จะทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะสีขาวชนิด compact callus และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ และในปี 1982 Wang และ Vasil รายการการชักนำแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของหญ้าเนเปียร์ (Napier or Elephant Grass) โดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เกิด compact callus สีขาว และสามารถชักนำการเกิด somatic embryogenesis มากกว่า 70% และจากการทดลองพบว่า สูตรอาหาร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการพัฒนาเป็นต้นและเกิดรากได้ดี (ภาพที่ 1)

MS + CW 50 ml



MS + CW 50 ml + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l	MS + CW 50 ml + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 1 mg/l	MS + CW 50 ml + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l + BA 0.5 mg/l	MS + CW 50 ml + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l



MS + CW 50 ml + 2,4-D 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 0.5 mg/l	MS + CW 50 ml + 2,4-D 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l + BA 1 mg/l	MS + CW 50 ml + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + BA 0.5 mg/l	MS + CW 50 ml + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l

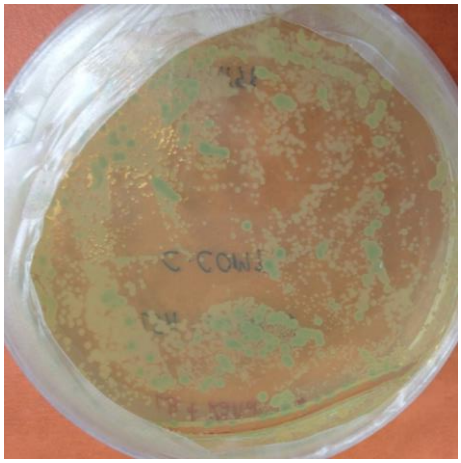
<u>ภาพที่ 1</u> การพัฒนาของใบอ่อนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 บนสูตรอาหาร MS ร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน 50 มิลลิลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การนำยีนเป้าหมายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียม *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation

การนำพลาสมิด pCAMBIA 2300 ที่มียีน COMT หรือ CCOMT หรือ CAD หรือ 4CL เข้าสู่ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation พบว่า สามารถนำพลาสมิดสายผสมเข้าไปได้ โดยการปรับตั้งค่าเครื่อง eletroporation ดังนี้

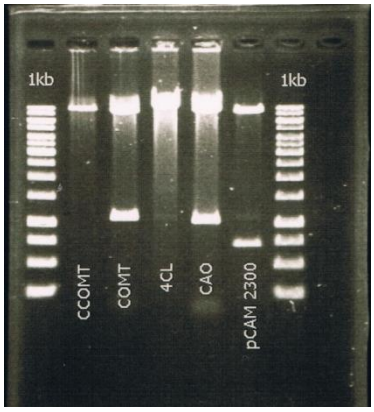
Cuvette gap	0.2	cm
Voltage	1.44	kV
Capacitor	25	μF
Resistor	360	Ω
Time constant	8-9	mSec

เมื่อนำมาคัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี white blue colony screening ของ *A. tumefaciens* บนอาหาร LB ร่วมกับ Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 µl ร่วมกับ X-gal ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 20 µl พบว่า เกิดลักษณะของ white blue colony ซึ่งทำให้ทราบเบื้องต้นของการนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* เนื่องจากการคัดเลือกนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียที่มีเพียงพลาสมิดเปล่า ออกจากเซลล์แบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งตรวจสอบได้โดยใช้ marker ที่เป็นยีนสร้างเบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) หรือยีน lac Z ที่บริเวณ lac Z ของพลาสมิดนี้จะเป็นบริเวณที่สามารถสอดแทรกยีนที่สนใจเข้าไปได้ ตามปกติแล้วยีน lac Z จะสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งย่อยน้ำตาลกาแลคโตส แต่ถ้ายีนนี้ถูกทำลายลงโดยการสอดแทรกด้วยยีนที่สนใจเข้าไปก็จะทำให้ยีน lac Z นี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้อีก ด้วยคุณสมบัติข้อนี้ในการแยกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดเปล่ากับเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมอยู่ออกจากกัน โดยใส่สารที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งมีชื่อว่า X-gal ที่ ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และสีที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าหากน้ำตาล X-gal ถูกย่อยลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกับสารปฏิชีวนะ ถ้ามีแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในจานอาหารสาร X-gal ก็จะถูกย่อย ทำให้เห็นโคโลนีของแบคทีเรียที่โตขึ้นมาเป็น สีฟ้า แต่ถ้ามีแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้จะเห็นโคโลนีเป็นสีขาว อันเนื่องมาจากยีน lac Z ถูกแทรกด้วยยีนที่สนใจทำให้ยีน lac Z ถูกทำลายจึงไม่มีเอนไซม์เกิดขึ้นและไม่มี การย่อย X-gal (ปฐมวดี, 2554)



ภาพที่ 2 แสดงผลของ white blue colony screening เมื่อคัดเลือกบนอาหาร LB ร่วมกับ Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม IPTG ร่วมกับ X-gal

จากนั้นนำโคโลนี่เดี่ยวมาเลี้ยงเป็น mater plate เพื่อทำการตรวจสอบโดยใช้วิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I จะพบการปรากฏของยีน CAD ที่มีขนาด 1,101 bp และ COMT ที่มีขนาด 1,083 bp (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ตรวจสอบการนำยีนเป้าหมายเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ (pCAMBIA 2300) ด้วยวิธี Electroporation

3. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยวิธี leaf disc

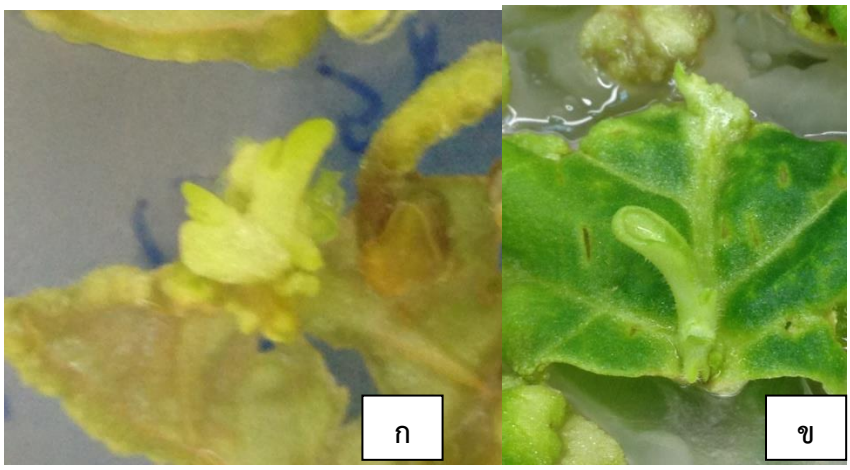
นำเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ที่มียีนยีน COMT หรือ CCOMT หรือ CAD หรือ 4CL ซึ่งได้เตรียมเป็น master plate มาเลี้ยงทำการ streak เพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 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 โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 4-6 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสาร acetosyringone 200 ไมโคร โมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ Agrobacterium ในการนำยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

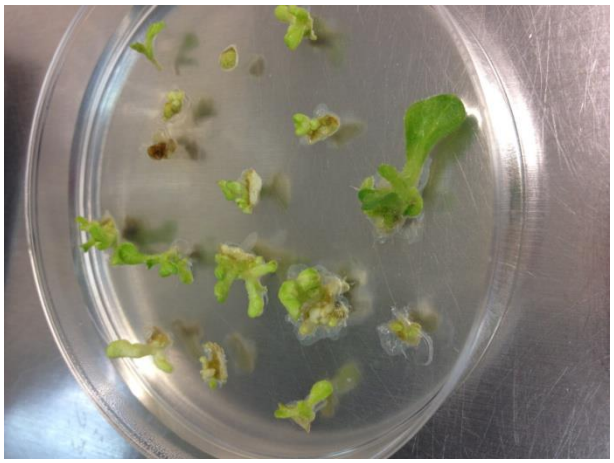
จากนั้นเตรียมชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 โดยการเลือก compact callus สีขาว นำมาแช่ในสารละลายที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* จากการทดสอบระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนใบลงในสารละลาย ที่มีเซลล์ พบว่า การแช่ชิ้นใบนาน 10 นาทีจะทำให้ประสิทธิภาพการเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อพืชของ *A. tumefaciens* นำแคลลัสขึ้นมาซับเซลล์แบคทีเรียออกบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ แล้วจึงย้ายเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหาร Co-cultivation สูตรอาหาร MS ที่มีน้ำมะพร้าวอ่อน 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อ *A. tumefaciens* ที่เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชมีปริมาณ

มากและสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้อจากเนื้อเยื่อของพืชได้ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจะทำให้เนื้อเยื่อแคลลัสกลายเป็นสีดำไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นยอดใหม่ได้ พบว่าเนื้อเยื่อแคลลัสได้ปลดปล่อย phenolic compound ออกมาจำนวนมาก ซึ่ง phenolic compound ที่มีมากเกินพอจะส่งผลเสียต่อสมดุลออกซินและไซโตไคนิน มีผลไปปิดกั้นในการสร้างอวัยวะของพืช (รังสฤษฎิ์, 2540) จากรายงานของ ฉัตรนภา (2544) พบว่า การทำลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยใช้ cefotaxime มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชโดยทำให้เนื้อเยื่อพืชหยุดการพัฒนาและตายในที่สุด และอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยผ่านอะโกรแบคทีเรียม คือชนิดของพืชที่ใช้ แม้ว่าอะโกรแบคทีเรียมจะสามารถบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้หลายชนิด แต่ก็ค่อนข้างจำกัดอยู่ในพืชใบเลี้ยงคู่ แม้ว่าจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียมที่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้แล้วก็ตาม Guangqin และ Guochang (2000) ได้กล่าวถึงการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมว่า จะประสบผลสำเร็จได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 3 ประการ คือ 1. ชนิดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการถ่ายยีนจะต้องเป็นส่วนที่การแบ่งเซลล์เกิดได้สูง และการชักนำให้เกิดต้นเกิดได้ง่าย 2. การเพิ่มการแสดงออกของยีน *vir* ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ acetosyringone (AS) ช่วยในการบุกรุกของอะโกรแบคทีเรียมทำให้การทกงานของยีน *vir* เพิ่มมากขึ้นในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทำให้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวประสบความสำเร็จ เช่น ข้าว ข้าวโพด และข้าวบ าร์เลย์ 3. สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียมที่ใช้ในการถ่ายยีน ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวต้องใช้อะโกรแบคทีเรียมที่มีความรุนแรง (supervirulent) เช่น สายพันธุ์ A281, LBA4404 และ EHA 101 นอกจากสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมต้องมีความรุนแรงแล้วชนิดของพาหะ (vector) ที่ใช้ต้องเป็นชนิด super-binary vector เช่น pTiBo542, pTOK233 และ pIG121Hm เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการเปลี่ยนพืชทดสอบเป็นยาสูบ โดยการเลือกใช้ใบยาสูบตัดใบให้มีขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อ *A. tumefaciens* เท่ากับ 0.6-0.8 โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 4-6 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสาร acetosyringone 200 ไมโคร โมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ Agrobacterium โดยการเลี้ยงบนอาหาร Co-cultivation สูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้บริเวณรอยตัดของใบ (ภาพที่ 4) จากนั้นทำการตัดแยกต้นยาสูบเพื่อเลี้ยงให้เจริญเติบโต เพื่อจะนำใบของต้นยาสูบไปตรวจสอบการเข้าของยีนต่อไป (ภาพที่ 5)



<u>ภาพที่ 4</u> การเกิดต้นใหม่ที่บริเวณรอยตัดของใบยาสูบ (ก) และการเกิดต้นใหม่บริเวณเส้นกลางใบ (ข) ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย วิธี leaf disc



ภาพที่ 5 ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สูตรอาหารเพื่อการชักนำแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ได้แก่ สูตรอาหาร MS ที่มี น้ำมะพร้าวอ่อน 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การนำยีนเป้าหมายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียม *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation สามารถทำได้โดยการปรับตั้งค่า ดังนี้

Cuvette gap	0.2	cm
Voltage	1.44	kV
Capacitor	25	μF
Resistor	360	Ω
Time constant	8-9	mSec

3. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยวิธี leaf disc โดยการใช้ชิ้นส่วนแคลลัสของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 การเลือกใช้สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกร่วมกับสารปฏิชีวนะที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้ และมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย

4. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยวิธี leaf disc โดยการใช้ชิ้นส่วนใบของยาสูบ สูตรอาหารสำหรับการคัดเลือกร่วมกับสารปฏิชีวนะที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดต้นใหม่ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้

เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการถ่ายฝากยีนให้พืชมีลักษณะที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการผลิตพลังงานทดแทนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ฉัตรนภา ข่มอาวุธ. 2544. การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเทคนิคที่เหมาะสมในการทำบาดแผลเพื่อการถ่ายยีน โดยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต. 2554. ขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม. คู่มือประกอบสื่อการสอนวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย วิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 36 หน้า.

ปาริสัชชา แสงสุวรรณ. 2547. การโคลนยีน glutamine synthetase และการถ่ายยีน ascorbate peroxidase เข้าสู่หญ้าเนเปียร์แคระ (*Pennisetum purpureum* cv. Mott). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 100 หน้า

รังสฤษฎิ์ กาวีเต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.

Guangqin, G. L. Wei and Z. Guochang. 2000. Agrobacterium-mediated transformation:state of art and future prospect. Chinese Science Bulletin 45:1537-1546.

Haydu, Z. and I.K. Vasil .1981. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration for Leaf Tissues and Anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. Theor Appl Genet 59:269-273

Kucers, A., S. M. Crowe, M. L. Grayson, and J. F. Hoy. 1997. Cefepime, p. 403-408. *In* A. Kucers, S. M. Crowe, M. L. Grayson, and J. F. Hoy (ed.), The use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, and antiviral drugs, 5th ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, United Kingdom.

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, embryogensis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Tritricum aestivum* L EM. Thell). Plant Science. 46 : 217-223.

Pradit, P., P. Surin, A. Jantakarn, T. Amara and T. Sayan. 2006. Production of Salt Tolerance Dwarf Napier Grass (Pennisetum purpureum cv. Mott) Using Tissue Culture and Gamma Irradiation. Kasetsart J.(Nat.Sci.) 40:625-633.

Wang, D.Y. and I.K. Vasil. 1982. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Inflorescence Segment of *Pennisetum purpureum* Schum.(Napier or Elephant Grass). Plant Science Letters, 25:147-154

Yu, T.A.,S.D. Yeh abd J.S. Yang. 2001. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 281-286.