รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาถั่วเหลือง
2. **โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและการนำไปใช้ประโยชน์ของถั่วเหลือง

   กิจกรรม 1. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) 1.3 ปรับปรุงถั่วเหลืองโดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

   01-12-54-01-01-03-02-54
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** การถ่ายยีนไซโคลฟิลินในถั่วเหลืองเพื่อทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Genetic Transformation of Cyclophilin Gene in Soybean for Abiotic Stress Tolerance
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	กษิดิศ ดิษฐบรรจง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้รวมงาน	ชยานิจ ดิษฐบรรจง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	สุภาวดี ง้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

การถ่ายยีนในถั่วเหลือง (*Glycine max* CL.) Merrill) ทำได้โดยการใช้ somatic embryo เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (starting explant) ของกระบวนการถ่ายยีน ขั้นตอนแรกประกอบด้วย การชักนำให้เกิด somatic embryo (somatic embryogenesis) ดำเนินการโดยใช้เมล็ดอ่อน (immature seed) เลี้ยงบนอาหาร MS และวิตามินสูตร B5 ร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 180 μM การชักนำให้ somatic embryo ระยะแรกพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ กระทำโดยนำ somatic embryo เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมวิตามินสูตร B5 และ 6% maltose สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ที่ใช้ คือ สายพันธุ์ EHA 105 โดยนำยีนไซโคลฟิลินเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium* ในรูปของ binary vector จากนั้นจึงดำเนินการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ somatic embryo ในถั่วเหลือง จากนั้นคัดเลือกเซลล์ถั่วเหลืองบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin แล้วชักนำให้เกิดต้นต่อไปบนอาหาร MS ที่เติมวิตามินสูตร B5 และ 6% maltose ตรวจสอบการปรากฏของยีนไซโคลฟิลินในต้นที่คัดเลือกได้โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyPXbal (forward) และ CyPKpnl (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวคเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35SCaMV(reverse) สามารถคัดเลือกต้นอ่อนที่มียีนดังกล่าว

6. คำนำ

ถั่วเหลือง (soybean, *Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เพราะเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมภายในประเทศหลายชนิด ในอดีตที่ผ่านมารัฐบาลมีนโยบายเร่งรัดผลิตถั่วเหลืองให้เพียงพอใช้ในประเทศ โดยดำเนินการเร่งรัดการผลิตควบคู่กับการกำหนดมาตรฐานการควบคุมการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์เพื่อให้ความคุ้มครองเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเหลือง ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นมาโดยตลอด แต่ยังไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ ปัจจุบันอนุญาตให้นำเข้าถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (GMOs) มาเพื่อใช้ในการอุตสาหกรรมหลายชนิด การปลูกถั่วเหลืองพบปัญหาและอุปสรรคในการเพาะปลูก เช่น โรคพืช แมลงศัตรูพืช และสภาพความแปรปรวนของดินฟ้าอากาศ ซึ่งปัจจุบันปัญหาดังกล่าวจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น สาเหตุเนื่องมาจากการทำลายทรัพยากรธรรมชาติของมนุษย์เอง จากปัญหาดังกล่าวทำให้เกษตรกรต้องปรับปรุงวิธีการเพาะปลูก รวมทั้งวางแผนการเพาะปลูกให้เหมาะสมกับสภาพดินฟ้าอากาศและ ปริมาณน้ำ ช่วงการเจริญเติบโตสำคัญที่ไม่ควรขาดน้ำคือช่วงการงอก ช่วงออกดอกและติดฝัก หากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมจะทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติสามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆได้ การนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองของไทยให้มีลักษณะทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆจึงเป็นเรื่องที่นักวิจัยต้องทำการวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ รวมทั้งการขยายพื้นที่ปลูกทั้งในเขตน้ำฝนและชลประทาน จึงได้นำเทคนิคการถ่ายยีนหรือพันธุวิศวกรรมมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง โดยการถ่ายยีนไซโคลฟิลิน (cyclophilin, CyP) เข้าสู่ถั่วเหลือง เพื่อให้มีลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้โดยเฉพาะการทนแล้ง

ไซโคลฟิลิน (CyPs) เป็นโปรตีนประเภทเปปติดิลโพลพิล ซีส-ทรานส์ ไอโซเมอเรส (PPlases) พบได้ทั่วไปในเซลล์ของออร์แกนเนล (organelle) ทั้งในเซลล์โปรคาริโอต และยูคาริโอต มีการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่พืชชนิดนั้นดำรงชีวิตอยู่ เช่น การได้รับผลกระทบจากโรค แมลงและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ จากการศึกษาพบว่าในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มียีนชนิดหนึ่งที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะความไม่เหมาะสมด้านต่างๆ คือ ยีนไซโคลฟิลิน โดยมีการสร้างภูมิคุ้มกันและยับยั้งกระบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ (Luan et al., 1994; Kong et al., 2001) ไซโคลฟิลินในพืชถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 โดยการสกัดแยก cDNA จากมะเขือเทศ ข้าวโพด พืชวงศ์ถั่วและคาโนลา (Gasser et al., 1990) ปัจจุบันมีรายงานพบลำดับเบสที่เหมือนกับยีนไซโคลฟิลินที่โคลนได้จากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง อ้อย ถั่วเหลือง ฝ้าย ยาสูบ มะพร้าวและอะราบิดอพซิส เป็นต้น อีกทั้งยังพบยีนชนิดนี้ในมนุษย์และสัตว์อีกด้วย ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ค้นหายีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะของการทนแล้งในข้าวฟ่าง และพบว่ามียีนไซโคลฟิลินที่มีการแสดงออกอย่างสูงเมื่อปลูกในสภาพแล้ง อีกทั้งยังพบว่าไซโคลฟิลินมีการแสดงออกอย่างสูงในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆจากพืชชนิดอื่นด้วย เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง พืชวงศ์ถั่ว คาโนลาและมันฝรั่ง

7. วิธีการดำเนินงาน

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของถั่วเหลือง

1. ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ไทย ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่1 เชียงใหม่6 เชียงใหม่60 และสจ.5 ในโรงเรือน

2. นำเมล็ดอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมสารจับใบทวีน 20 ประมาณ 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที ล้างคลอรอกซ์ออก 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3. นำเมล็ดอ่อนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ตัดเอาส่วนเอมบริโอแอกซิส (embryo axis) ออก เพื่อให้ได้ส่วนของใบเลี้ยงอ่อน

4. นำใบเลี้ยงอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ (embryoid induction medium) ซึ่งประกอบด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยใช้วิตามินตามสูตรอาหารสังเคราะห์ B5 (Gamborg et al., 1968) ร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้นต่างๆ คือ 90, 180 และ 270 μM น้ำตาลซูโครส (sucrose) 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น (Phyta gel) 0.3 เปอร์เซ็นต์ และปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเป็น 5.8 (ดัดแปลงจากบัวทิพย์, 2540) โดยวางใบเลี้ยงอ่อนให้ส่วนโค้งของใบเลี้ยงสัมผัสกับอาหารในขวดทดลอง (Santos et al., 2006) ขวดละ 10 ชิ้น

5. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 8 ซ้ำ

6. บันทึกจำนวนใบเลี้ยงอ่อนที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด และจำนวนใบเลี้ยงอ่อนที่มีการเกิดเอมบริออยด์ (embryoids) เพื่อนำมาคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์โซมาติกเอมบริโอเจเนซิส (\%)} = \frac{\text{จำนวนใบเลี้ยงอ่อนที่เกิดเอมบริออยด์}}{\text{จำนวนใบเลี้ยงอ่อนที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

การทดลองที่ 2. การเพาะเลี้ยงเอมบริออยด์ในอาหารเหลว

นำเอมบริออยด์ของถั่วเหลือง มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MF5 (ประกอบด้วยอาหาร MS วิตามินตามสูตร B5 ใช้ 2,4-Dความเข้มข้น 22.5 μM (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลูตามิน (glutamine) 2.192 กรัมต่อลิตร; ดัดแปลงจาก Finer and Nagasawa, 1988 และ บัวทิพย์, 2540) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเป็น 5.8 เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมอาหารเหลวขวดละ 20 มิลลิลิตร ใส่เอมบริออยด์ขวดละประมาณ 0.1-0.5 กรัมเปลี่ยนอาหารทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยวางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า ชั่งน้ำหนักสดเอมบริออยด์ทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหาร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 8 ซ้ำ นำน้ำหนักสดเอมบริออยด์มาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของเอมบริออยด์ ดังนี้ (บัวทิพย์, 2540)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (\%)} = \frac{W - Wo}{Wo} \times 100$$

Wo = น้ำหนักสดเอมบริออยด์เริ่มต้น

W = น้ำหนักสดเอมบริออยด์ครั้งสุดท้าย

การชักนำให้เอมบริออยด์พัฒนาเป็นต้นอ่อน

1. ย้ายเอมบริออยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากข้างต้นลงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรการชักนำให้เกิดการพัฒนาสุกแก่ (maturation medium) ซึ่งประกอบด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS วิตามินตามสูตร B5 ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเป็น 5.8 เพาะเลี้ยงนานถึง 1-2 เดือน (บัวทิพย์, 2540)

2. ย้ายเอมบริออยด์ที่มีการพัฒนาจนสุกแก่แล้ว ลงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดต้น (regeneration medium) ซึ่งประกอบด้วยอาหาร MS ที่มีน้ำตาล maltose 6 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเป็น 5.8 เพาะเลี้ยงนานถึง 2 สัปดาห์ - 2 เดือน (ดัดแปลงจากRanjitha et al., 2006; Finer and Nagasawa, 1988)

การทดลองที่ 3. การถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วเหลืองโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)

การเตรียมเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีน CyP (สุภาวดี และคณะ, 2555) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2x yeast extract and tryptone (2xYT) (ปริมาตร 1 ล. : bacto-tryptone 16 ก. yeast extract 10 ก. NaCl 10 ก. agar 1.5% pH 7.5) เติมสารปฏิชีวนะ kanmycin (50 มก./ล.) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2-3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT – kanmycin ที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200-250 รอบ/นาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความเข้มข้นที่ OD 600 ประมาณ 0.5-1.0 ซึ่งเป็น log phase จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ เทลงในหลอดทดลองขนาด 105 มล. นำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเหลวในหลอดทิ้ง จากนั้นทำการละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ โดยเติมอาหารเหลว MS เตรียมไว้สำหรับใช้ในการถ่ายยีน

การถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วเหลือง (ดัดแปลงจากวิธีการของ Santarm and Finer, 1999; Horsch et al., 1985) โดยนำเซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีน CyP มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ถั่วเหลือง โดยนำไปจุ่มในอาหารเหลว MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* เจือจาง 1 : 20 เป็นเวลา 1 นาที แล้วผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman no. 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + B5 vitamins + 180 μM 2,4-D + 3% sucrose + 0.3% (w/v) gelrite pH 5.7 ในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 3 วัน (co-cultivation) จากนั้นนำเซลล์ถั่วเหลืองไปเลี้ยงบนอาหารเดิมที่เติม carbenicillin 400 มก./ล. เป็นเวลา 4

สัปดาห์เพื่อกำจัด *Agrobacterium* เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7 วัน หลังจากนั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปอีก 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตรเดิมที่ลดปริมาณ carbenicillin ลงเหลือ 200 มก./ล. และเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน

หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยย้ายชิ้นส่วนเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารเดิม (MS + B5 vitamins + 180 μM 2,4-D + 3% sucrose) ที่เติม kanmycin (10 มก./ล.) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ คัดเลือกเซลล์อ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อชักนำให้เอมบริออยด์สุกแก่ (maturation medium) และพัฒนาเป็นต้นอ่อน (regeneration medium; MS + B5 vitamin + 6% maltose + 0.5% acticated charcoal) เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ นำต้นที่ได้จากการถ่ายยีนมาตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

การทดลองที่ 4. การตรวจสอบการปรากฏของยีนโดยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากใบต้นอ่อนถั่วเหลืองที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกในอาหารคัดเลือก ประมาณ 0.1-0.3 ก. โดยใช้ Genomic DNA Extraction Kit นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและวัดค่าความเข้มข้น OD และนำมาเจือจางด้วย TE buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม จากนั้นทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyPXbal (forward) และ CyPKpnl (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวคเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) นำผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ

สถานที่ทำการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2554 - กันยายน 2558

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

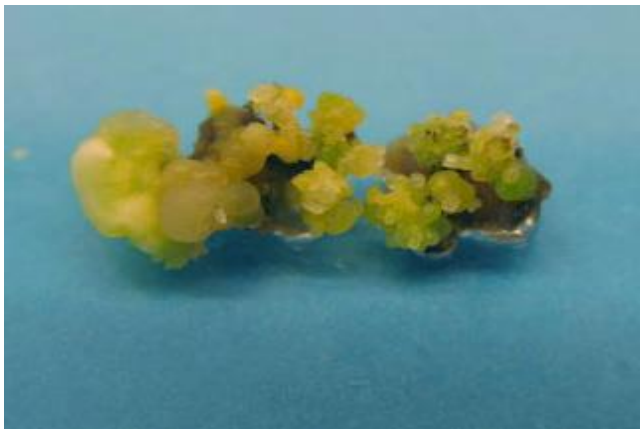
การทดลองที่ 1. การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง

เมื่อนำใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ซึ่งประกอบด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS วิตามินสูตร B5 น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 180 μM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริออยด์สูงสุดทั้งสี่พันธุ์ (24.2-16.7%, ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของบัวทิพย์ (2540) เอมบริออยด์ที่เกิดขึ้นมีหลายลักษณะ โดยอาจเป็นโครงสร้างเดี่ยวๆหรือเกิดเป็นกลุ่มก้อน มีสีครีมใสจนออกเหลืองหรือมีสีเขียวอ่อนและรูปร่างทรงกลม (globular) เป็นส่วนมาก (ภาพที่ 1) โดยเอมบริออยด์ชนิดนี้เกิดขึ้นกับถั่วเหลืองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้นสูงเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shoemaker et al. (1991) ที่พบว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดรูปร่างของเอมบริออยด์ชนิดทรงกลมเป็นส่วนมาก ส่วนระยะเวลาของการชักนำการให้เกิดเอมบริออยด์ของแต่ละพันธุ์อยู่ในช่วง 24-30 วันหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำ (induction medium) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1. ผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอในถั่วเหลือง

2,4-D (μM)	พันธุ์ถั่วเหลือง[1/]			
	สจ 5	**เชียงใหม่ 1**	**เชียงใหม่ 6**	**เชียงใหม่ 60**
90	4.5 b	5.4 b	6.1 b	14.9 b
180	20.2 a	16.7 a	22.5 a	24.2 a
270	8.6 b	5.8 b	3.2 b	6.5 b

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)



ภาพที่ 1. การเกิดโซมาติกเอมบริโอจากใบอ่อนถั่วเหลืองบนอาหารชักนำ (induction medium)

ตารางที่ 2. การเกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิสและระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำจากใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 180 μM

พันธุ์	โซมาติกเอมบริโอเจเนซิส (%)[1]	ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ (วัน)
สจ 5	22.5 ab	28.5
เชียงใหม่ 1	18.2 b	30.6
เชียงใหม่ 6	20.8 b	29.2
เชียงใหม่ 60	25.9 a	24.1

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

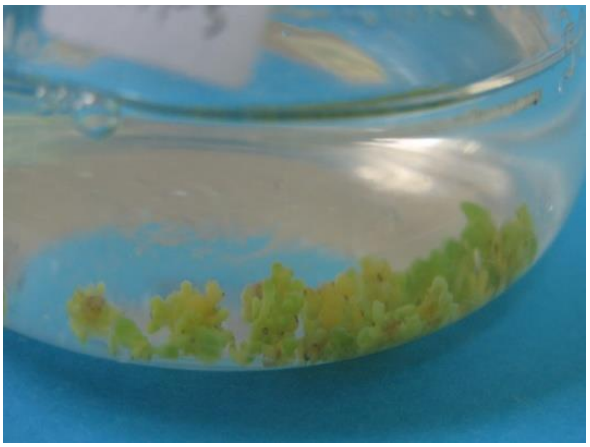
การทดลองที่ 2. การเพาะเลี้ยงเอมบริออยด์ในอาหารเหลว

ในการนำเอมบริออยด์มาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MF 5 ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตร MS ใช้วิตามินสูตร B5 กลูตามิน 2.192 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของเอมบริออยด์ พบว่า เอมบิออยด์มีการพัฒนาและสามารถเพิ่มจำนวนได้ โดยเมื่อเลี้ยงเอมบริออยด์ไปได้ประมาณ 5 สัปดาห์ กลุ่มของเอมบริออยด์จะหลุดจากกันเป็นกลุ่มก้อนเล็กๆ หรืออาจเป็นโครงสร้างเดี่ยวๆมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 2) มีการเพิ่มปริมาณมากกว่าเดิม พันธุ์ที่มีอัตราการเพิ่มปริมาณสูงที่สุดคือ เชียงใหม่ 60 (225%) สอดคล้องกับบัวทิพย์ (2540) ซึ่งรายงานว่า พันธุ์ เชียงใหม่ 60 มีการเพิ่มปริมาณของเอมบริออยด์สูง รองลงมาคือ สจ 5 (142%) ส่วนเชียงใหม่ 1 และเชียงใหม่ 6 มีอัตราการเพิ่มปริมาณ 83 และ 86 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อนำเอมบริออยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจากข้างต้นมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรการชักนำให้เกิดการพัฒนาสุกแก่ (maturation medium) ซึ่งประกอบด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS วิตามินตามสูตร B5 ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ เอมบริออยด์มีการพัฒนาเป็น somatic embryo ที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของเอมบริออยด์ถั่วเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 5 สัปดาห์

พันธุ์	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสิ้นสุด (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสด
สจ 5	0.38	0.93	142 b
เชียงใหม่ 1	0.45	0.81	83 c
เชียงใหม่ 6	0.48	0.89	86 c
เชียงใหม่ 60	0.42	1.39	225 a

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan’s New Multiple Range Test)



ภาพที่ 2. การเพิ่มปริมาณเอมบริออยด์ในอาหารเหลว

ภาพที่ 3. โซมาติกเอมบริโอที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วมีใบเลี้ยง 2 ใบชัดเจน

การทดลองที่ 3. การถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)

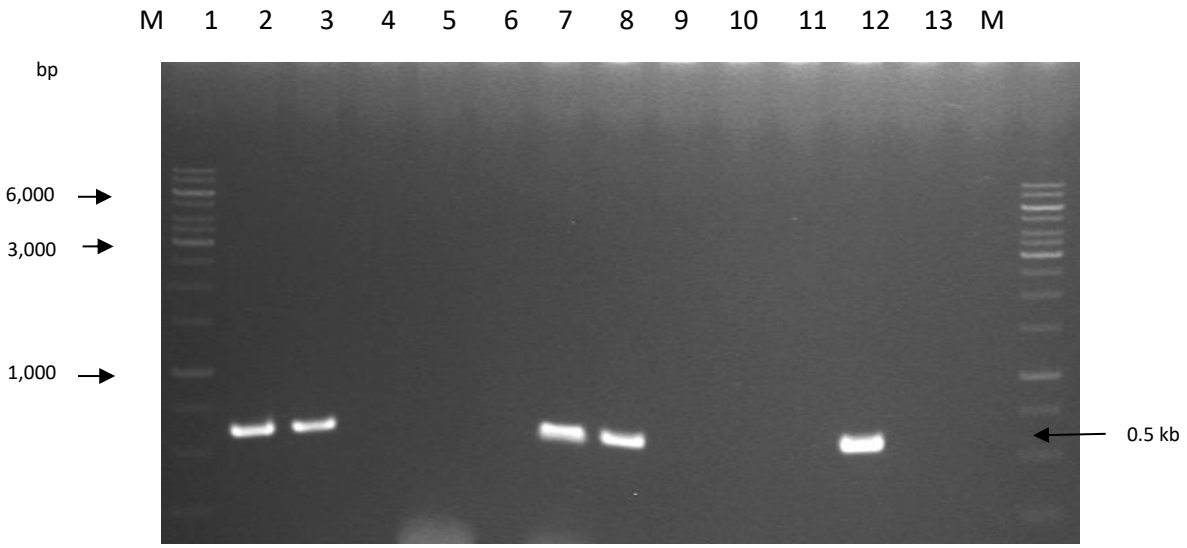
การถ่ายยีนไซโคลฟิลินที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA 2300 เข้าสู่ถั่วเหลืองโดยการใช้เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 ภายหลังการถ่ายยีนต้องกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบออกจากพืชให้หมด โดยการใช้สารปฏิชีวนะชนิด carbenicillin 400 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งปริมาณที่ใช้มีความเหมาะสมสามารถกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช จากนั้นคัดเลือกเซลล์ที่รอดชีวิตย้ายลงในอาหารเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นอ่อน เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ จนได้ต้นอ่อนถั่วเหลืองที่นำมาตรวจสอบการปรากฏของยีนไซโคลฟิลิน (ภาพที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการถ่ายยีนแล้ว พบว่า การถ่ายยีนโดยใช้ somatic embryo ใช้ได้ผลดีในถั่วเหลือง (Santarm and Finer, 1999) ส่วนการใช้ข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) ไม่ประสบความสำเร็จในการทดลองครั้งนี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นสารคัดเลือก (selectable marker) ที่ใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยถ่ายยีนคัดเลือกนี้เข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนเป้าหมาย พืชที่ได้รับการถ่ายยีน

จะไม่เป็นอันตราย ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตายในอาหารคัดเลือก งานวิจัยนี้พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายฝากยีนสามารถพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

ภาพที่ 4 การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของถั่วเหลืองโดยมีการพัฒนาเป็น polyembryos

การทดลองที่ 4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค PCR

ผลการทดสอบการปรากฏของยีนไซโคลฟิลินจากต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน คือ CyPXbal (forward) และ CyPKpml (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวคเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35S CaMV (reverse) พบต้นถั่วเหลืองที่สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (kb) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับยีนที่ได้สอดแทรกเข้าไปในจีโนมของถั่วเหลือง ในขณะที่ต้นถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5. ผลการวิเคราะห์ PCR ของต้นอ่อนถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) CyPX*bal* (forward). Lane M = 1 kb ladder (Fementas). Lane ที่ 13 = control, Lane 1,2,6,7 และ 11 พบการปรากฏของยีน

9. **สรุปผลการทดลอง**

1. การถ่ายยีนในถั่วเหลืองสามารถทำได้โดยใช้ somatic embryo เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น
2. การชักนำให้เกิด somatic embryo ในถั่วเหลือง กระทำได้โดยใช้เมล็ดอ่อนเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมวิตามินสูตร B5 และ 2,4-D ความเข้มข้น 180 μM
3. การถ่ายยีนไซโคลฟิลินในถั่วเหลืองสามารถทำได้โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105
4. การถ่ายยีนในถั่วเหลืองโดยใช้ข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ไม่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ พัฒนาต่อโดยการทดสอบความทนทานต่อสภาพเครียดของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม

11. **คำขอบคุณ** -

12. **เอกสารอ้างอิง**

บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ. 2540. การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองทนทานต่อความเป็นพิษของอลูมินัมลารขาดจุลธาตุอาหารโดยการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 160 หน้า.

สุภาวดี ง้อเหรียญ, พยุงศักดิ์ รวยอารี, กษิดิศ ดิษฐบรรจง, ชยานิจ ดิษฐบรรจง และ หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2555. การโคลนและวิเคราะห์ยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างและการถ่ายยีนเข้ายาสูบ. วารสารวิชาการเกษตร. 30 (1) : 2-22.

Finer, J.J., A. Nagasawa. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 15 : 125-136.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Plant cell cultures : I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

Gasser, C.S., D.A. Gunning, K.A. Budelier and S.M. Brown. 1990. Structure and expression of cytosolic cyclophilin peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher-plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. Proc. National Acad. Sci. 87 : 9519-9523.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Plant Sc.i. 227 : 1229-1231.

Kong, H.Y., S.C. Lee and B.K. Hwang. 2001. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. Physiol. Mol. Plant Pathol. 59 : 189-199.

Luan, S., M.W. Albers and S.L. Schreiber. 1994. Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher-plant. Proc. National Acad. Sci. 91 : 984-988.

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Ranjitha Kumari, B.D., A. Settu and G. Sujatha. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. Indian J. of Bot. 5 : 243-245.

Santarm, E.R. AND J.J. Finer. 1999. Transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. In Vitro Cell. and Dev. Biol.-Plant . 35 : 451-455.

Santos, K., J. Mariath, M. Moco and M. Bodanese-Zanettini. 2006. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) : Ontogeny of somatic embryos. Braz. Arch. Biol. Technol. 49(1) : 16-22.

Shoemaker, R.C., L.A. Amberger, R.G. Palmer, L. Oglessy and J.P. Ranch. 1991. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 27 : 84-88.

13. ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. องค์ประกอบอาหารสูตร MS ของ Murashige and Skoog (1962) และสารประกอบ อินทรีย์สูตร B5 ของ Gamborg et al. (1968)

องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
Stock 1	
NH_4NO_3	1,650.0
KNO_3	1,900.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0
$MgSO_4.7H_2O$	370.0
	170.0
Stock 2	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Stock 3	
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.30
Stock 4	
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	1.0
Pyridoxine-HCl	1.0
Thiamine-HCl	10.0