นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือกต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อ และการปลูกถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์โซเนต

คนานาง จันทนวรรณ[1] และ สมปอง เตชะโต[1]

Abstract

Juntanawan, K. and Te-chato, S.

Effect of antibiotics selection on survival rate of nodal explant and gene transformation in *Anthurium andraeanum* cv. Sonate

Songklanakarin J. Sci. Technol., May 2007, 29(Suppl. 2) : 229-236

The effects of various concentrations of hygromycin antibiotic supplemented in modified Murashige and Skoog (MMS) on the survival rate of nodal explant of *Anthurium andraeanum* cv. Sonate were determined. The use of hygromycin at 50 mg/l caused absolute death of nodal tissue after 4 weeks of culture. Dipping nodal explant with agrobacterium, EHA 105 containing pCAMBIA1301 for 15 min followed by co-culture on filter paper laid on MMS with 0.5 mg/l benzyladenine (BA), 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) and 200 mg/l cefotaxime for 2 days then transferring the explant to culture on MMS supplemented with the above phytohormones and 50 mg/l hygromycin resulted in the highest survival rate at 26.6% with 4 shoots/callus. Histochemical analysis of gus activity was found in callus after 6 weeks of nodal culture and in leaf from shoot derived from the callus.

Key words : anthurium, hygromycin, node, gene transformation

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาพืชศาสตร์ [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: stechato@yahoo.com

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2549 รับลงพิมพ์ 7 พฤศจิกายน 2549

บทคัดย่อ

คนานาง จันทนวรรณ และ สมปอง เตชะโต

ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือกต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อและการปลูกถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์โซเนต

ว. สงขลานครินทร์ วทท. พฤษภาคม 2550 29(ฉบับพิเศษ 2) : 229-236

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เติมในอาหารสูตรดัดแปลง Murashige และ Skoog (MMS) ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อหน้าวัวพันธุ์โซเนต พบว่า ความเข้มข้น 50 มก./ลิตร ทำให้เนื้อเยื่อส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์ดังกล่าวตายทั้งหมดภายในเวลา 4 สัปดาห์ การจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อกับอะโกรแบคทีเรีย EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 เป็นเวลา 15 นาที แล้วเลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหารสูตร MMS เติมเบนซิลอะดินิน (BA) ไธไดอะซูรอน (TDZ) เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร เท่ากัน และซีโฟทาซิม 200 มก./ลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตข้างต้น และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 50 มก./ลิตร ให้อัตราการสร้างแคลลัสจากข้อสูงสุด 26.66% จำนวนยอด 4 ยอด ตรวจพบกิจกรรมของยีน gus ทั้งในแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงข้อ 6 สัปดาห์ และใบจากยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสในอีก 6 สัปดาห์ต่อมา

หน้าวัว (*Anthurium* spp.) อยู่ในวงศ์ Araceae (Arum Family) เป็นไม้ดอกพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ ไม้ดอกชนิดนี้มีมากมายหลายชนิด จากการสำรวจพบว่า มีประมาณ 1,500 ชนิด (วิเชษฐ, 2540) มีทั้งชนิดไม้ตัดดอกและชนิดไม้กระถาง หน้าวัวมี 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ *Anthurium andraeanum* ส่วนใหญ่ใช้ตัดดอกเป็นที่นิยมในประเทศ และ *Anthurium schzerianum* ปลูกเป็นไม้ตัดดอก และไม้กระถาง เป็นที่นิยมในสหรัฐอเมริกา เช่น หน้าวัวพันธุ์โซเนต เป็นหน้าวัวพันธุ์ต่างประเทศนำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ มีจานรองดอกรูปหัวใจสีชมพูสดมันเล็กน้อย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอมแดง ร่องน้ำตาไม่ลึก หูจานรองดอกชิดกัน ปลีดอกสีชมพูเข้มกว่าจานรองดอกเล็กน้อย (วชิรพงศ์, 2545) ปัญหาที่พบในการผลิตหน้าวัวเป็นการค้ามักเกี่ยวกับเรื่องโรคและแมลง เช่น โรคใบแห้ง โรคใบไหม้ โรคใบด่าง และไร จึงทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิต (พนิดา, 2547) ปัจจุบันเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามามีบทบาทในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ การถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมเป็นเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชที่สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของพืชได้ตามที่ต้องการ ซึ่งใช้หลักการคือการส่งถ่ายพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย และสารพันธุกรรมที่ส่งถ่ายเข้าไปแทรกเชื่อมต่อกับโครโมโซมของเซลล์เป้าหมายทำให้เกิดการแสดงออกในลักษณะทางพันธุกรรมที่สารพันธุกรรมเหล่านั้นควบคุม ลักษณะทางพันธุกรรมเหล่านั้นมีความสามารถในการถ่ายต่อไปยังรุ่นลูกเหมือนในพืชปกติได้ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือการเข้าทำลายของโรคและแมลง

อะโกรแบคทีเรียมที่มีความสามารถในการส่งถ่าย T-DNA (transferred DNA) เข้าสู่พืชนั้นมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ *Agrobacterium tumefaciens* มี Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้างปุ่มปมในพืช และ *Agrobacterium rhizogenes* มี Ri-plasmid (root inducing plasmid) ซึ่งส่งเสริมการสร้างรากลอยในพืช (Kosuge *et al.*, 1992) ปัจจุบันนิยมใช้อะโกรแบคทีเรียมทั้งสองชนิดในการส่งถ่าย T-DNA เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในพืชหลายชนิด เช่น ยางพารา (ชวนพิศ, 2544) มังคุด (เริ่มอรุณ, 2541) โกโก้ (Mayolo *et al.*, 2003) ยาสูบ (Hong *et al.*, 2005) หน้าวัว (Kuehnle and Sugii, 1991) กุหลาบ (Kim *et al.*, 2004) และปอชวา (Herath *et al.*, 2005) ดังนั้นการถ่ายยีนเพื่อแก้ปัญหาเรื่องโรค แมลง และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาพันธุ์หน้าวัว อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีความจำเพาะสำหรับพืชแต่ละชนิด ดังนั้นการศึกษาการถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์ที่สนใจจึงเป็นสิ่งจำเป็น อย่างไรก็ตามในหน้าวัวได้มีรายงานการถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์ *Alii* และพันธุ์ลูกผสม 'UH1060' โดยใช้ชิ้นส่วนรากเลี้ยงร่วมกับ

เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCa2Att เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เติม BA 2.2 μM และสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม 250 มก./ลิตร และคานามัยซิน 50 มก./ลิตร ซึ่งจากรายงานดังกล่าว พบว่า การใช้รากเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นสามารถถ่ายยีนเข้าสู่หน้าวัว และได้ต้นที่มีความต้านทานต่อคานามัยซิน (Chen *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานใช้ชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ดังนั้นในรายงานนี้จึงได้ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกและวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 (ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และมียีน gus เป็นยีนรายงาน) เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการถ่ายยีนในหน้าวัวต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้ต้นหน้าวัวสายพันธุ์โซเนตภายในสภาพปลอดเชื้ออายุ 6 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มก./ลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณต้นโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับข้างต้น และย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 26±2°C ภายใต้การให้แสง 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชม/วัน

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหน้าวัวเป็นอาหารสูตร Murashige และ Skoog ดัดแปลง (MMS) ที่มีการเติมอะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 100 มก./ลิตร อาหารสูตรดังกล่าวดัดแปลงโดยการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักบางอย่างลงครึ่งหนึ่งจากสูตรเดิมเหลือความเข้มข้นดังนี้คือ NH_4NO_3 825 มก./ลิตร KNO_3 950 มก./ลิตร KH_2PO_3 85 มก./ลิตร $FeSO_4 7H_2O$ 13.9 มก./ลิตร และ Na_2EDTA 18.6 มก./ลิตร ปรับ pH 5 .7 อาหารที่เตรียมแล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม. นาน 15 นาที

เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก และยีน gus เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็ง LB (Luria Broth) ที่เติมคานามัยซิน 50 มก./ลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2°C ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อ

ใช้ชิ้นส่วนข้อจาก ต้นหน้าวัวในหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS เติมซูโครส 3% วุ้นตรานางเงือก 0.75% เติม TDZ และ BA เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร เท่ากัน และปรับ pH 5.7 เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ลิตร เพาะเลี้ยงภายในขวด 8 ออนซ์บรรจุอาหาร 15 มล เพาะเลี้ยงภายในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26±2°C แต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 ชิ้น หลังเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกอัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อแต่ละความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ DMRT (Duncan's multiple range test)

2. ศึกษาวิธีการและระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนของหน้าวัว

นำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงในในสภาพปลอดเชื้อมาจุ่มแช่ในสารแขวนลอยเชื้อ อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 (ที่ผ่านการอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า OD = 1.6) เป็นเวลา 15, 30, 45 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS เติม BA และ TDZ เข้มข้น 0.5 มก./ลิตร เท่ากัน และไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ลิตร ในจานเพาะเลี้ยงซึ่งบรรจุอาหาร 15 มล 2 วิธีคือ

1) เลี้ยงบนอาหารที่บรรจุในจานเพาะเลี้ยงโดยตรง (Direct method)

2) เลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหารข้างต้น (Filter paper method)

วิธีที่ 2 เลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่จุ่มแช่ *A tumefaciens* บนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งวางบนอาหารสูตรข้างต้นเติมไฮโกรมัยซิน 50 มก./ลิตร เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนข้อไปเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ลิตร เพาะเลี้ยงภายในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28±2°C แต่ละระยะเวลาการจุ่มแช่ และวิธีการเลี้ยงร่วมทำ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น ตรวจสอบการตอบสนองของข้อ (อัตรารอดชีวิต การสร้างแคลลัส และพัฒนายอด) ในแต่ละระยะเวลา และวิธีการเลี้ยงร่วมเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ DMRT สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS นั้นทำ 2 ระยะคือ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกข้างต้น และหลังจากนั้นอีก 6 สัปดาห์ เมื่อมีการสร้างยอดโดยการเก็บตัวอย่างแคลลัส และใบมาใส่ในจานหลุม (titer plate) 3-4 ชิ้นต่อหลุม เติมส่วนผสมของสารละลาย X-gluc (X-gluc เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 26 ไมโครลิตร กับ lysis buffer ปริมาตร 1 มล) ลงไปในหลุมๆ ละ 250 ไมโครลิตร นำไปดูดด้วยเครื่องดูดสูญญากาศเป็นเวลา 20 นาที อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วยเมทธิลแอลกอฮอล์ 3-4 ครั้ง ตรวจสอบสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อที่เกิดจากปฏิกริยาของเอนไซม์-Glucuronidase กับ X-gluc บันทึกผลการเกิดจุดสีน้ำเงิน (blue spot) เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลา และวิธีการเลี้ยงร่วมโดยใช้แผนการทดลองข้างต้น

ผลการทดลอง

1. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนข้อ

การเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร MMS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นที่ 0 และ 10 มก./ลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 100% ชิ้นส่วนข้อมีสีเขียวสด ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 มก./ลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 80%, 46.67% และ 13.33% ตามลำดับ ชิ้นส่วนข้อมีสีเขียวซีดปนน้ำตาล ส่วนระดับความเข้มข้นที่ 50 มก./ลิตร ชิ้นส่วนข้อมีอัตรารอดชีวิต 0% ชิ้นส่วนข้อมีสีซีดขาวหรือสีน้ำตาล (Figure 1)

2. วิธีการและระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนของหน้าวัว

วิธีการเลี้ยงร่วมโดยใช้กระดาษกรองวางบนอาหารชักนำการพัฒนาการของชิ้นส่วนข้อให้การสร้างแคลลัส จำนวนยอด และกิจกรรมของ GUS สูงกว่าการเลี้ยงร่วมในอาหารโดยตรง (Table 1) ทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสามารถถ่ายยีนได้ การจุ่มแช่เชื้อเป็นระยะเวลาสั้นสามารถถ่ายยีนได้ มีอัตราการรอดชีวิตบนอาหารเติม

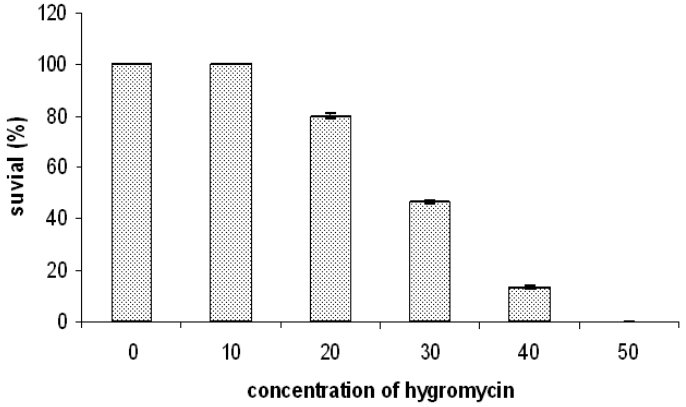

Figure 1. Effect of hygromycin on survial pencentage of nodal explant on MMS medium for 4 weeks.

Table 1. Effect of co-cultivation period and methods with *A. tumefaciens* on development of nodal explants on MMS medium supplemented with 50 mg/l hygrpomycin, 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ for 6 weeks.

Co-culture Period (min)	Co-culture method	Callus forming Explant (%)	Number of shoots	Number of blue spot[x]
0 (control)	Direct	0	0b	0c
	Filter paper	0c	0b	0c
15	Direct	20a	4a	8b
	Filter paper	26.66a	4a	12a
30	Direct	13.33b	1b	1c
	Filter paper	20a	5a	13a
45	Direct	13.33b	2b	12a
	Filter paper	13.33b	3	11a
F-test		*	*	*
C.V.(%)		42.19	50.63	12.48

*** : Significant different at p=0.05**
Means not sharing common letter within column differ significantly by DMRT
[x]Transient expression of GUS activity at 8 weeks of culture transformed nodal explant on MMS with 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l TDZ and 50 mg/l hygromycin.

สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินสูงสุด 26.6% ให้การพัฒนายอดจากแคลลัส 4 ยอด และมีกิจกรรมของ GUS 12 จุด การจุ่มแช่เป็นระยะเวลานานขึ้นไม่มีผลต่อการถ่ายยีน การจุ่มแช่เป็นเวลา 45 นาทีส่งผลให้การถ่ายยีนลดลง

จากการตรวจสอบการถ่ายยีนในระยะที่มีการพัฒนาให้ยอดรวมโดยนำใบยอดมาตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ก็ยังตรวจพบพบยีนที่ได้รับการถ่ายอยู่ในทุกระยะเวลาการจุ่มแช่ (15-45 นาที) (Figure 2) และยอดดังกล่าวเจริญเพิ่มปริมาณได้ดีในอาหารเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

วิจารณ์

จากการนำชิ้นส่วนข้อของหน้าวัววางเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินคัดเลือก พบว่า ความเข้มข้น 50 มก./ลิตร ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อของหน้าวัวตายทั้งหมดภายในเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chai และคณะ (2004) ที่พบว่าการใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ลิตร ส่งผลให้อัตราการตายของชิ้นส่วนรากหญ้าสนาม 100% และความเข้มข้นดังกล่าวใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกการถ่ายยีนได้ นอกจากนี้ ทศพรและคณะ (2546) รายงานการใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ลิตร เป็นความเข้มข้นสำหรับตรวจสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเพื่อเป็นดัชนีในการชี้วัดการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับชิ้นส่วนเมล็ดและแคลลัส สำหรับระยะเวลาการจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชกับเชื้อนั้นโดยทั่วไปอยู่ในช่วงสั้น ๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อส่งเสริมการส่งถ่ายยีนโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ในการศึกษานี้พบว่าการจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อหน้าวัวเป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายไปเลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน (48 ชม) สามารถถ่ายยีนได้สำเร็จจากการตรวจสอบกิจกรรมของ gus สูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารโดยตรง ในขณะที่รากหน้าวัวพันธุ์ *Alii* และพันธุ์ลูกผสม 'UH1060' ใช้เวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCa2Att เพียง 1 วัน (24 ชม) (Chen *et al.*, 1997) ส่วนแคลลัสข้าวที่ชักนำจากเอ็มบริโอ ได้รายงานการใช้เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTOK233 เป็นเวลา 3 วัน (Hoque *et al.*, 2005) ความแตกต่างของเวลาเลี้ยงร่วมอาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกันมีการสร้างสารเคมีในกลุ่มที่เอื้อต่อการ

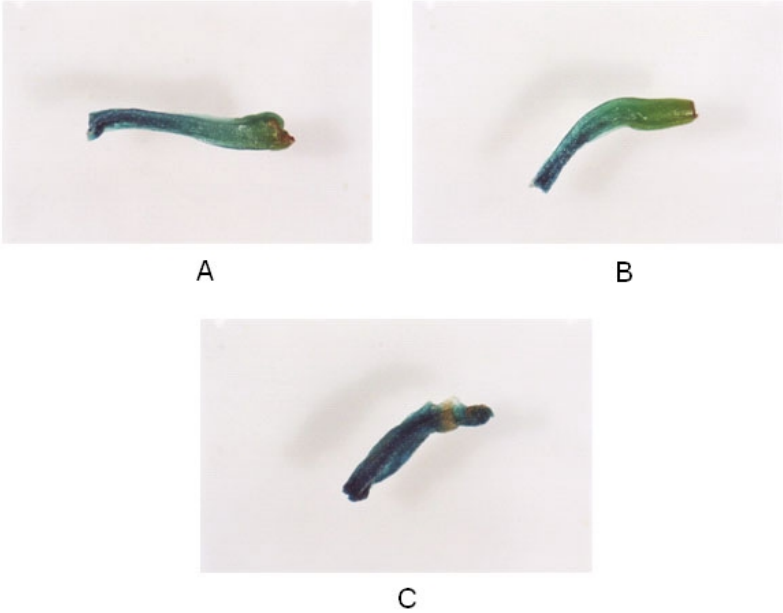

Figure 2. Stable expression of gus from regenerate shoot of *Anthurium andraeanum* cv. Sonate at various co-cultivation times with A. tumefaciens ìEHA 105î
A 15 minute
B 30 minute
C 45 minute
[Color figure can be viewed in the electronic version]

ส่งถ่ายยีนได้ในชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน รวมถึงพันธุ์ที่ใช้ก็แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตาม สมัชชา และสมปอง (2544) ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pBI 121 สายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pTok 233 และสายเชื้อ EHA 101 มี พลาสมิด pIG 121 เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนใบโฮย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกโดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยระยะเวลาเลี้ยงร่วมก็ส่งถ่ายยีนได้ เช่นเดียวกับกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงิน เอื้องสามสี เอื้องคำ และเอื้องเขาแกะ ซึ่งมีรายงานว่าการเลี้ยงโพรโตคอร์ม และต้นอ่อน เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pBI 121 เป็นเวลา 30 นาทีแล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกโดยตรงสามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ (ประวีณา และคณะ, 2546) สำหรับพืชยืนต้นหรือพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น พิมเสนต้องใช้เวลาในการอินคูเบทแคลลัสกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ที่มี พลาสมิด pIG 121 เวลา 7 วัน (Sugimura *et al.*, 2005)

การกำจัดเชื้อส่วนเกินโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนกระดาษกรองนับเป็นลดการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ดี ทั้งนี้เพราะกระดาษกรองช่วยซับเชื้อส่วนเกินจำนวนมากให้เหลือในปริมาณที่พอเหมาะแก่การกำจัดด้วยสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม นอกจากนี้เชื้อส่วนเกินไม่สัมผัสกับอาหารเลี้ยงโดยตรงจึงไม่มีอาหารเพื่อการเจริญอย่างเพียงพอ เชื้อคงเกาะเป็นแผ่นฟิล์มติดเฉพาะบริเวณชิ้นส่วนข้อเท่านั้น และเชื้อดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช

สรุป

อัตราการรอดชีวิตจากชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์โซเนตลดลงตามระดับความของไฮโกรมัยซินที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้คัดเลือกชิ้นส่วนข้อที่ได้รับการถ่ายยีนคือ 50 มก./ลิตร ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์ดังกล่าวตายทั้งหมดภายในเวลา 4 สัปดาห์วิธีการจุ่มแช่เชื้อเป็นเวลา 15 นาที แล้วเลี้ยงร่วมโดยใช้กระดาษกรองเป็น

เวลา 2 วัน ทำให้ชิ้นส่วนข้อมีอัตราการรอดชีวิตสูง 26.66% หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหาร MMS เติมไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ลิตร ข้อสร้างแคลลัสและพัฒนาให้ยอดได้ในอาหารดังกล่าว ในขณะที่ยอดที่ไม่ผ่านการจุ่มแช่ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของยีน gus ในแคลลัสที่พัฒนาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ และยอดที่ชักนำจากแคลลัสดังกล่าวในเวลาต่อมาก็ปรากฏจุดสีน้ำเงินทั้งที่เป็นไคเมอราและทั้งชิ้นส่วน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย และภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

ชวนพิศ นิยะกิจ. 2544. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) และการปลูกถ่ายยีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทศพร พิพัฒน์ภานุกูล สุมลทิพย์ บุนนาค ปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์ และมานิตย์ โฆษิตตระกูล. 2546. การส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *Agrobacterium tumefaciens*. ว. วิทย. มข. 31: 167-175.

ประวีณา คงโนนกอก สุมลทิพย์ บุนนาค และปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์. 2546. การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้บางชนิด โดย *Agrobacterium tumefaciens*. ว. วิทย. มข. 31: 85-94.

พนิดา แก้วมณี. 2547. การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาโรคพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เริ่มอรุณ รักเผือก. 2541. การเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium* spp.) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วชิรพงศ์ หวลบุตตา. 2545. คู่มือคนรักต้นไม้ "หน้าวัว". กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 95 น.

วิเชษฐ ค้าสุวรรณ. 2540. ไม้ตัดดอก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. 73 น.

สมัชชา นาคสมบัติ และสมปอง เตชะโต. 2544. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบตำเลีย (*Hoya* spp) และการปลูกถ่ายยีน. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 23: 193-201.

Chai, M.L., Senthil, K.K. and Kim, D.H. 2004. Transgenic plant of colonial bentgrass from embryogenic callus via *Agrobacterium* - mediated transformation. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 77: 165-171.

Chen, F.C., Kuehnle, A.R. and Sugii, N. 1997. *Anthurium* roots for micropropagation and Agrobacterium tumefaciens - mediated gene transfer. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 49: 71-74.

Hong, S., Kim, K. l., Chung, H.Y., Kim, Y.J., Sunter, G., Bisaro, D.M. and Chung, I.S. 2005. Expression of recombinant endostatin in *Agrobacterium* - inoculated leaf - disks of *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 80: 321- 327.

Hoque, Md.E., Mansfield, J.W., and Bennett, M.H. 2005. *Agrobacterium* - mediated transformation of indica rice genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficency. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 82: 45-55.

Kim, C.K., Chung, J.D., Park, Burrell, S.H., Kamo, K.K. and Byrne, D.H. 2004. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 78: 107-111.

Kosuge, T., Meredth,C.P. and Hollaende, A.R. 1992. Genetic Engineering of Plant, an Agricultural Perspective. Plenum Press, New York.

Kuehnle, A.R. and Sugii, N. 1991. Induction of tumors in *Anthurium andraeanum* by Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. and Vander, M.J.A.J. 1974. Plantlets formation in callus tissue of *Anthurium andraeanum* Linn. Sci. Hort. 2: 193-198.

Mayolo, G.A., Maximova, S.N., Pishak, S. and Guiltinan, M.J. 2003. Moxalactam as acounter-selection antibiotic for *Agrobacterium*-mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. Plant Sci. 164: 607-615.

Herath, S.P., Suzuki, T., and Hattori, K. 2005. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of kenaf. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 82: 201-206.

Sugimura, Y., Kadotani, N,. Ueda, Y and Shima, K. 2005. Transgenic patchouli plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 82: 251-257