บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การหาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) ดัดแปลงพันธุ์โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* การทดลองนี้ใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIHI-IG(SX) ใช้ยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส (*gus*) เป็นยีนรายงานผล โดยแปรผันปัจจัยต่างๆดังนี้ ปัจจัยแรกคือ ระยะการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยแบ่งออกเป็น ระยะการเจริญ mid log phase (18 ชั่วโมง) late log phase (24 ชั่วโมง) และ stationary phase (36 ชั่วโมง) ที่นำมาเลี้ยงร่วมกับ cotyledon explant ของผักบุ้งอายุ 7 วัน ในขั้นตอน cocultivation เติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำ cotyledon explant มาวางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explant เพื่อกำจัด *A. tumefaciens* ด้วยสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอนความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจหา cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสโดยแช่ cotyledon explant ในสารละลาย 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิล บีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอธานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ตรวจนับและเปรียบเทียบจำนวน cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส ปัจจัยแรกเมื่อบ่ม cotyledon explant ร่วมกับ *A. tumefaciens* ที่ระยะการเจริญต่างๆ พบว่า *A. tumefaciens* ระยะการเจริญ late log phase จะทำให้ได้ cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส มากที่สุดคือ 41 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *A. tumefaciens* ที่ระยะการเจริญ mid log phase และ stationary phase ก่อให้เกิด cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส 17 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือกใช้ *A. tumefaciens* ที่ระยะการเจริญ late log phase ในการทดลองต่อไป ซึ่งระยะการเจริญนี้ สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้ เช่น Rashid และคณะ (1996) ถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าว (*Oryza sativa* L.) Hoshino และคณะ (1998) ถ่ายโอนยีนเข้าสู่องุ่น (*Vitis vinifera* L. cv. Koshusanjaku) และ Otani และคณะ (1998) ถ่ายโอนยีนเข้าสู่มันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) โดยใช้ *A. tumefaciens* EHA101 อายุ 24 ชั่วโมง ในการถ่ายโอนยีนขั้นตอน cocultivation

ปัจจัยที่สอง ความเข้มข้นของเซลล์ *A. tumefaciens* แปรผันความเข้มข้นของเซลล์ *A. tumefaciens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร MS ซึ่งใช้ในขั้นตอน cocultivation เป็น 3 ความเข้มข้น คือ 4.3×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 9.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 1.8×10^{15} เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส คิดเป็น 41 52 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่การใช้ *A. tumefaciens* เข้มข้น 1.8×10^{15} เซลล์ต่อมิลลิลิตรนั้นพบว่า cotyledon explant จำนวนมากเน่า เนื่องจากการเจริญของ *A. tumefaciens* ที่มากเกินไป (overgrowth) จึงเลือกใช้ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 9.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการทดลองต่อไป

ปัจจัยที่สาม ระยะเวลาการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับ cotyledon explant ในกระบวนการ cocultivation โดยแปรผันเป็น 30 นาที 60 นาที และ 120 นาที ได้ cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส คิดเป็น 52 73 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า cotyledon explant ที่บ่มไว้กับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 120 นาทีนั้น มีจำนวนเซลล์ของผักบุ้งที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส หรือมีจำนวนจุด สีน้ำเงินบน cotyledon explant มากกว่าเมื่อบ่มไว้กับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 60 นาที ถึงประมาณ 2 เท่า เนื่องจากโอกาสที่จะได้ต้นอ่อนที่มียีนที่ถ่ายโอนมาจาก *A. tumefaciens* แปรผันโดยตรงกับจำนวนจุดสีน้ำเงิน หรือจำนวนเซลล์ของผักบุ้งที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส ดังนั้นจึงเลือกบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ไว้กับ cotyledon explant เป็นเวลา 120 นาที ในการทดลองต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับ Chabaud และคณะ (1998) รายงานผลการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช alfafa ว่าตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนคือ ระยะเวลาในขั้นตอน cocultivation การบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับ explant เป็นเวลา 4 วัน ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนสูงกว่าการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับ explant เป็นเวลา 2 และ 3 วัน แต่ทั้งนี้ต้องควบคุมปริมาณเซลล์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้ไม่ให้มากเกินไป เพราะจะไปทำลายเนื้อเยื่อของ explant

ปัจจัยสุดท้ายคือ ความเข้มข้นสุดท้ายของอะซิโตไซริงโอน โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 0 50 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ พบว่าได้ cotyledon explant ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส คิดเป็น 31 75 48 และ 31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของอะซิโตไซริงโอนคือ 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งอะซิโตไซริงโอนมีความสำคัญต่อกระบวนการถ่ายโอนยีนในพืช ดังเช่นรายงานของ Hoshino และคณะ (1998) ที่พบว่าหากเติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จะเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่องุ่น หรือ Rashid และคณะ (1996) พบว่าประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าว จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมอะซิโตไซริงโอนเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ในขั้นตอน cocultivation เป็นต้น

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการสร้างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ในงานวิจัยนี้ คือ ใช้ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIHI-IG(SX) ซึ่งเจริญในระยะ late log phase (24 ชั่วโมง) ความเข้มข้น

เซลล์ *A. tumefaciens* 9.0 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ในขั้น cocultivation และบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับ cotyledon explant ของผักบุ้งอายุ 7 วัน เป็นเวลา 120 นาที และที่ภาวะเหมาะสมนี้ ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนจาก *A. tumefaciens* EHA101 เข้าสู่เซลล์ของผักบุ้งมีค่าสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงเท่าๆกับที่ Chabaud และคณะ (1988) ได้รายงานการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ alfafa ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์

ใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้ข้างต้นสร้างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์โดยนำ cotyledon explant ที่ผ่านการ cocultivation ร่วมกับ *A. tumefaciens* แล้ว มาล้างเซลล์ *A. tumefaciens* ออกด้วยสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอนความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในภาวะที่มีแสงสีขาว ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ของ cotyledon explant สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่งความถี่ของการงอกเป็นต้นใหม่ (regeneration efficiency) นี้มีค่าต่ำกว่ารายงานของ Akaracharanya และคณะ (2001) ที่ศึกษาการงอกเป็นต้นใหม่ของผักบุ้งจากส่วน cotyledon explant อายุ 7 วัน และกระตุ้นด้วยไธเดียซูรอน ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีค่าความถี่ของการงอกสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในงานวิจัยนี้ไม่มีการควบคุมความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ความชื้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของเนื้อเยื่อพืช เมื่อนำต้นอ่อนซึ่งเจริญจาก cotyledon explant มาทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าจากต้นอ่อนจำนวน 200 ต้นที่นำมาทดสอบ มีเพียง 5 ต้นที่ไม่ตายสามารถเจริญได้ นำผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินนี้มาทำการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีเพียง 2 ต้นที่ยังสามารถเจริญได้ ย้ายต้นอ่อนของผักบุ้งดังกล่าวมาปลูกบนอาหารแข็ง MMS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะเพื่อให้ผักบุ้งเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ นำลำต้น ใบ และรากของต้นผักบุ้งที่เจริญสมบูรณ์แล้วมาแช่ในสารละลาย 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิล บีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เพื่อตรวจหากิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส พบว่า ชิ้นส่วนของต้นผักบุ้งทั้ง 2 ต้น ที่นำมาทดสอบมีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส เรียกต้นผักบุ้งที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสว่าผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 4 และหมายเลข 7 นำผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 4 และหมายเลข 7 มาตรวจสอบโดยวิธี PCR เพื่อยืนยันการถ่ายโอนยีน *gus* และยีน *hpt* จาก *A. tumefaciens* มายังผักบุ้ง โดยนำดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้งสองต้นดังกล่าวมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ซึ่งออกแบบจากข้อมูลลำดับเบสของโปรโมเตอร์ชนิด Cauliflower mosaic virus 35s และข้อมูลลำดับเบสของยีน

gus ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 390 เบส ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้เมื่อใช้พลาสมิด pBIHI-IG(SX) ซึ่งมียีน *gus* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ แสดงว่าผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 4 และหมายเลข 7 มียีน *gus* สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมจริง ตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของยีน *hpt* โดยวิธีเดียวกับการตรวจหายีน *gus* แต่ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ซึ่งออกแบบจากข้อมูลลำดับเบสของยีน *hpt* พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 เบส แสดงว่ามียีน *hpt* สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 4 และ หมายเลข 7 จริง

ก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานเกี่ยวกับวิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้ง รายงานวิจัยนี้เป็นรายงานวิจัยแรกที่ได้ทำการพัฒนาวิธีการ และหาภาวะเหมาะสมในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้งโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* ที่ภาวะเหมาะสมนี้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนมีค่าสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ วิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้งนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งเพราะสามารถนำไปใช้เป็นวิธีการสร้างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มีสมบัติดีกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม เช่นมีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น หรือเป็นสายพันธุ์เพื่อการบำบัดมลภาวะในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากผักบุ้งเป็นพืชที่เจริญเร็วมาก และสามารถเจริญได้ทั้งบนดินและในน้ำ ตัวอย่างเช่น การถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการนำซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซีสเตอีนเข้าสู่ผักบุ้ง เพื่อทำให้ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับซัลเฟตที่มีมากเกินไปในแหล่งน้ำที่เจริญอยู่ หรือการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้งเพื่อให้ผักบุ้งสามารถสร้างและปล่อยสารหรือเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมที่เจริญอยู่ เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย