บทที่ 1

บทนำ

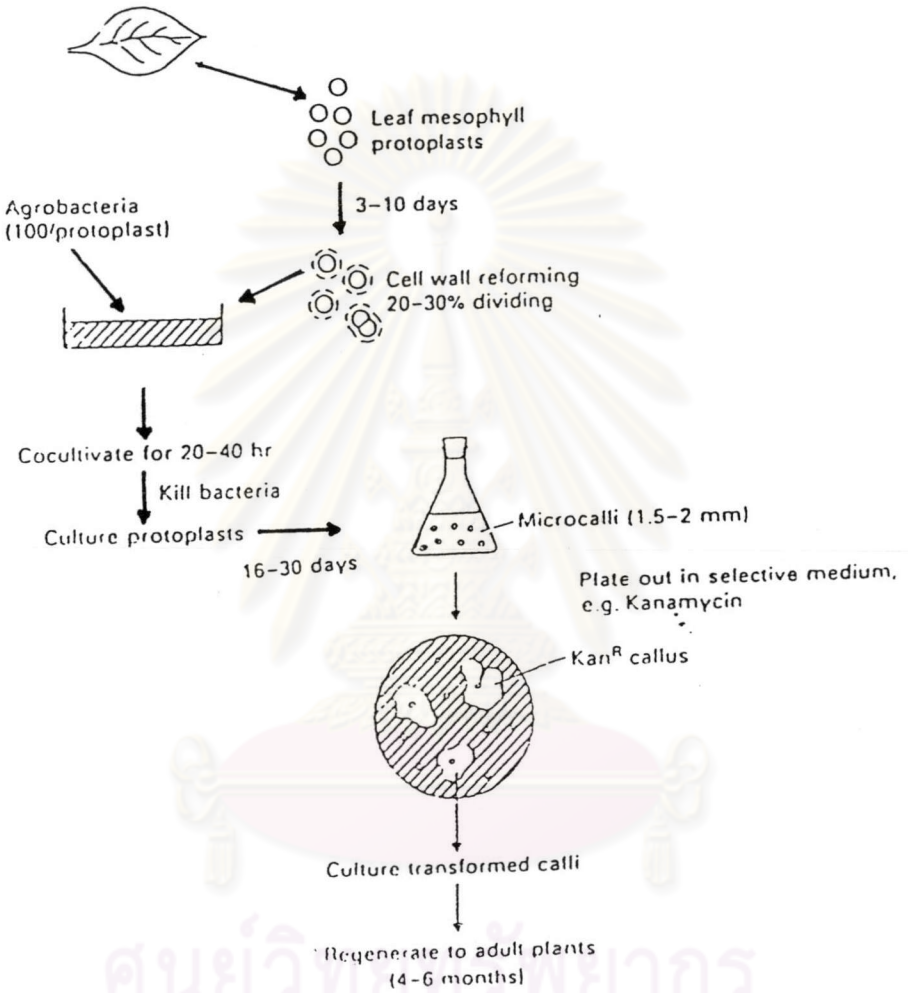
ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) เป็นพืชที่เจริญได้ทั้งบนดินและในน้ำ เจริญเติบโตเร็ว ขยายพันธุ์ได้ง่ายเพราะสามารถงอกรากได้ที่บริเวณข้อของลำต้น เจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่เน่าเสีย (polluted water) (Mori และคณะ,1999) และเพราะมีอัตราการเจริญเร็วมาก จึงทำหน้าที่ดูดซับสารที่มีมากเกินไปในดินหรือในแหล่งน้ำที่เจริญได้เร็วมากด้วย พบว่าการปนเปื้อนของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำ ทำให้สาหร่ายเจริญได้ดี แหล่งน้ำธรรมชาติที่มีสาหร่ายเจริญได้ดีจะไม่สามารถนำมาใช้ผลิตเป็นน้ำบริโภคได้ เนื่องจากผักบุ้งมีอัตราการดูดซับซัลเฟตและไนโตรเจนได้สูงพอๆกับผักตบชวา (water hyacinth) (Frukawa และ Fujita , 1993) ซึ่งเป็นพืชที่นิยมปลูกเพื่อใช้ในการบำบัดคุณภาพของแหล่งน้ำ ดังนั้นการดัดแปลงพันธุ์ผักบุ้งให้มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซับสารที่มิใช่สารพิษแต่ปนเปื้อนในดินหรือแหล่งน้ำมากเกินไป โดยผักบุ้งสามารถนำสารที่ดูดซับเข้าไปได้นั้นไปสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่บริโภคได้และมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ต่อไป หรือการดัดแปลงพันธุ์ผักบุ้งให้สามารถสร้างและปล่อยสารที่สามารถย่อยสลายสารพิษในดินหรือแหล่งน้ำที่เจริญอยู่ จะทำให้ได้ผักบุ้งพันธุ์ใหม่ๆที่สามารถนำมาใช้บำบัดคุณภาพของดินและแหล่งน้ำ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งด้านการแก้ไขและปรับปรุงสภาพแวดล้อม โดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างผักตบชวา ทั้งนี้เพราะผักบุ้งเป็นพืชที่คนและสัตว์สามารถนำมาบริโภคได้

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมอาจทำโดยการถ่ายโอนยีนโดยตรงเช่น วิธีอิเลคโทรพอเรชัน (electroporation) วิธี Microinjection หรือวิธี Microprojectile bombardment และวิธีการถ่ายโอนยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งวิธีการใช้ *Agrobacterium* นี้ใช้ได้ดีกับพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons) และเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด (Walden และคณะ, 1997) *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยอยู่ในดิน สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ทางบาดแผล ทำให้พืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม เรียก Crown gall disease ทั้งนี้เพราะ *A. tumefaciens* สามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิด Ti เข้าสู่โครโมโซมของพืช ยีนส่วน T-DNA มียีนประมวลรหัสฮอร์โมนพืชพวกออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (cytokinins) จึงทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวรวดเร็วและไม่จำกัดเกิดเป็นปุ่มปมหรือก้อนเนื้องอก หลักการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยอาศัย *Agrobacterium* ทำโดยการขจัดยีนประมวลรหัสฮอร์โมนพืชออกจากยีนส่วน T-DNA แล้วนำยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้ามาสอดแทรกแทน เมื่อยีนส่วน T-DNAสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ยีนที่ต้องการถ่ายโอนก็จะถูก

นำเข้าไปด้วย James และคณะ (1993) รายงานว่าอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone) สามารถเร่งการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens*

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* แบ่งออกเป็น 3 วิธี (Kingsman,1988) คือ

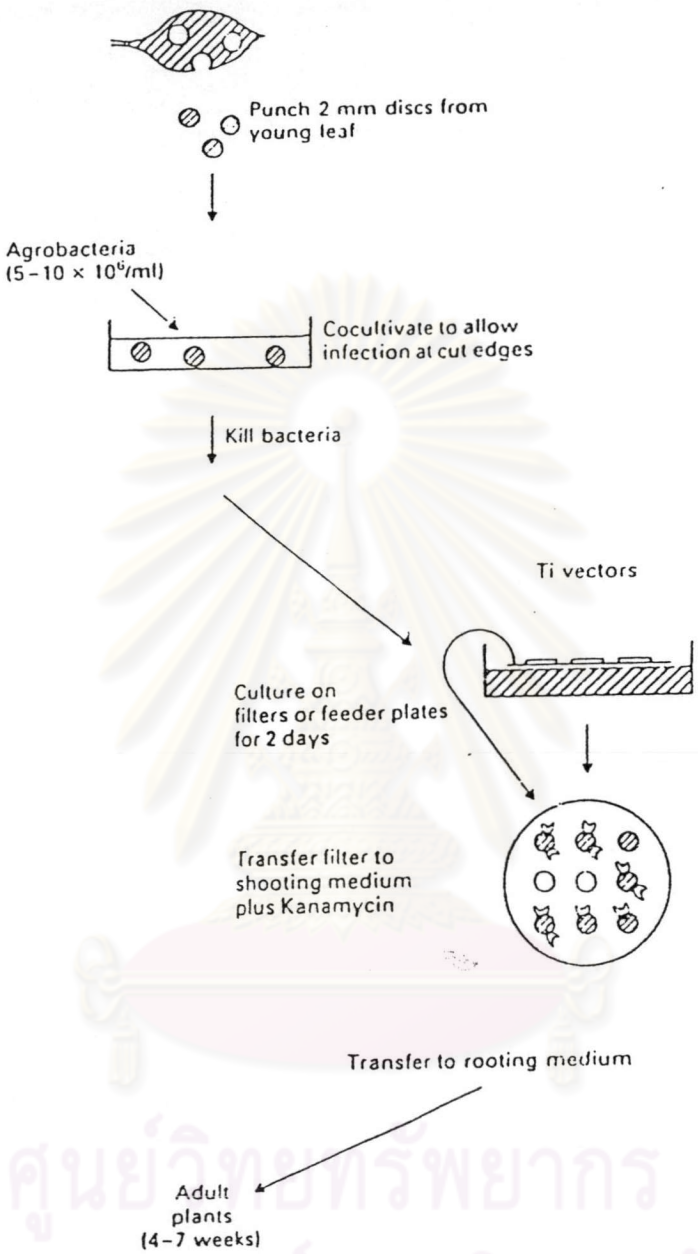
1. เลี้ยง *A. tumefaciens* ร่วมกับโปรโตพลาส (co-cultivation with protoplast) ดังแสดงในภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 การถ่ายโอนยีนโดยเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับโปรโตพลาสโดยการทำให้เซลล์พืชอยู่ในรูปของโปรโตพลาสแล้วนำมาเลี้ยงร่วมกับ*Agrobacterium* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนที่ต้องการถ่ายโอนเป็นเวลา 20-40 ชม. จากนั้นฆ่าเชื้อ *Agrobacterium* แล้วนำโปรโตพลาสไปเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสจนเกิดเป็น Microcalli เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร นำ Microcalli ไปวางบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกแคลลัสที่มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะแล้วย้ายแคลลัสที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกไปเพาะเลี้ยงจนได้ต้นที่สมบูรณ์ต่อไป (Kingsman, 1988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ถ่ายโอนยีนโดยใช้ใบพืชที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc method) ดังแสดงในภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.2 การถ่ายโอนยีนโดยใช้ใบพืชที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ทำโดยการตัดใบอ่อนของพืชเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนที่ต้องการถ่ายโอนในอาหารสังเคราะห์ เพื่อให้เกิดการติดเชื้อของ *Agrobacterium* ที่บริเวณของการตัด จากนั้นฆ่าเชื้อ *Agrobacterium*แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญไปเป็นต้นอ่อนและสารปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกต้นอ่อนที่มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือก นำต้นอ่อนที่ต้านต่อสารปฏิชีวนะมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีฮอร์โมนกระตุ้นการสร้างรากเพื่อให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต่อไป (Kingsman, 1988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การใช้ *Agrobacterium* บุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชทางบาดแผล ดังแสดงในภาพที่ 1.3

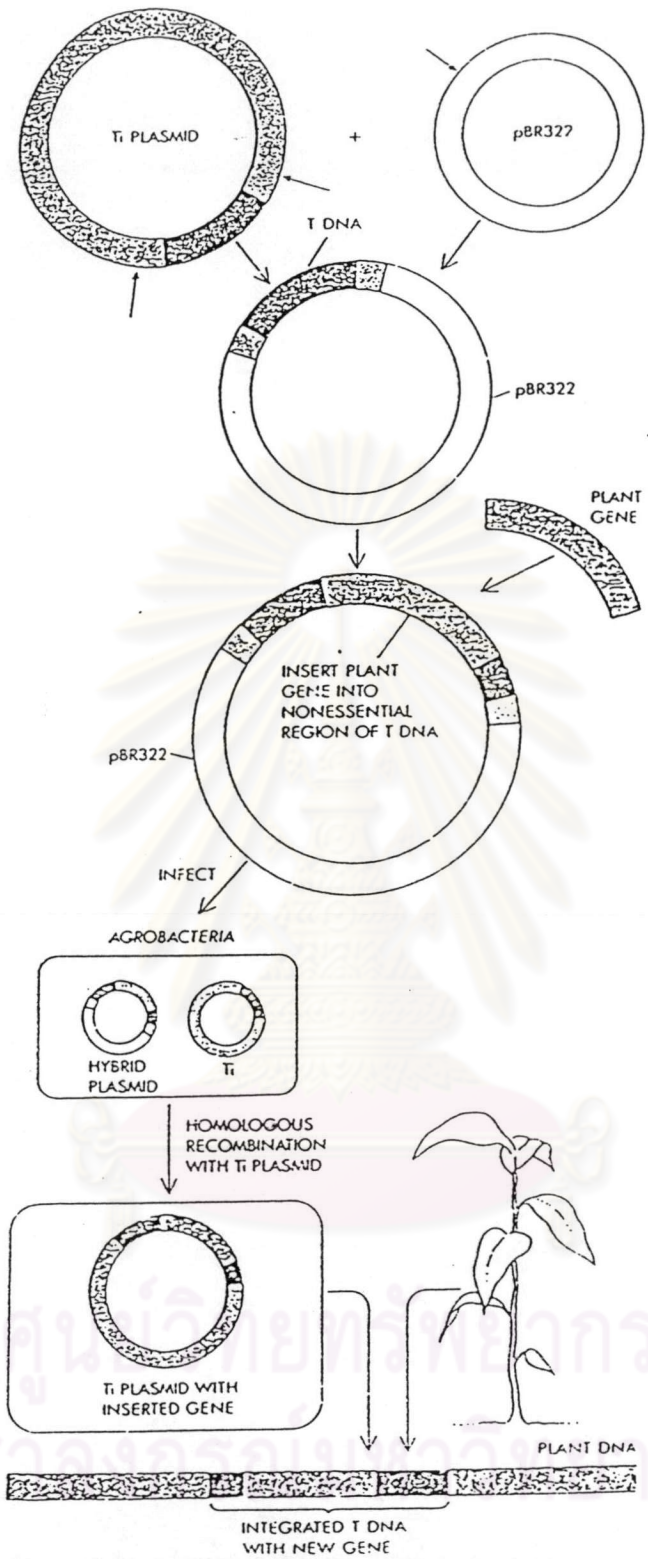
ภาพที่ 1.3 การถ่ายโอนยีนโดยใช้ *Agrobacterium* บุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชทางบาดแผล ทำโดยตัดชิ้นส่วนของพืชให้เกิดบาดแผล ทำให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดการติดเชื้อ *Agrobacterium* จากนั้นฆ่าเชื้อ *Agrobacterium* แล้วนำชิ้นส่วนของพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ เพื่อคัดเลือกพืชที่มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะนั้นๆ ย้ายแคลลัสที่ต้านต่อสารปฏิชีวนะไปเพาะบนอาหารที่มีฮอร์โมนเร่งการเจริญไปเป็นต้นและราก เพื่อให้แคลลัสนี้สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต่อไป (Kingsman, 1988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พลาสมิดพาหะ Ti สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดย *Agrobacterium* แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. ชนิดโคอินทิเกรต (cointegrate vector) (สุรินทร์ ปิยะโชคคณานุกูล, 2539; Watson และคณะ, 1975) พลาสมิดชนิดนี้เกิดจากการนำยีนส่วน T-DNA ของพลาสมิด Ti มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Escherichia coli* และภายในยีนส่วน T-DNA มีตำแหน่งจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งสามารถตัดและสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปได้ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดชนิดนี้ เมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด Ti ยีนส่วน T-DNA ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและของพลาสมิด Ti จะเกิดกระบวนการโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination) ของยีนส่วนที่เหมือนกันในบริเวณ T-DNA เกิดเป็นพลาสมิด Ti ซึ่งมียีนส่วน T-DNA ที่มาจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหรือมียีนที่ต้องการถ่ายโอนอยู่ในส่วน T-DNA นั่นเอง ดังนั้น *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด Ti นี้ เมื่อเข้าสู่เซลล์พืชจึงสามารถถ่ายโอนยีนที่ต้องการเข้าสู่โครโมโซมพืชได้ ดังแสดงในภาพที่ 1.4

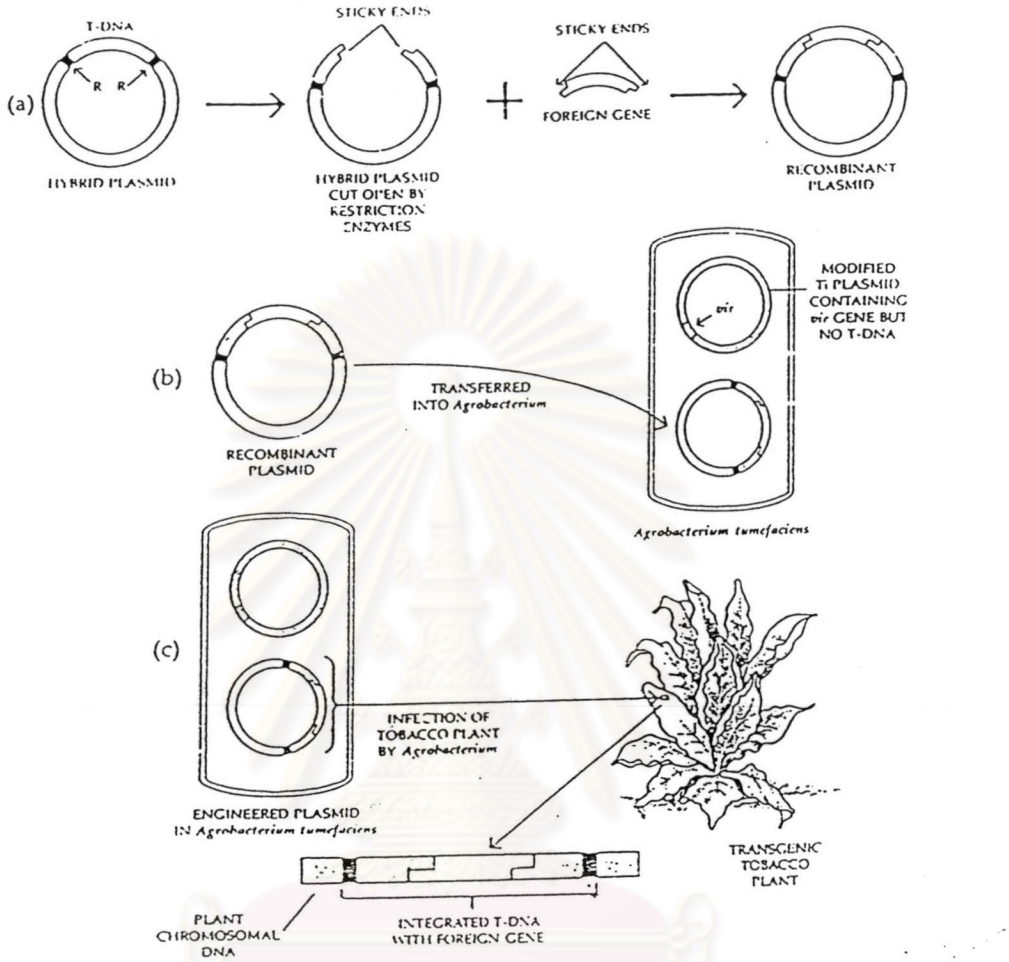
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1.4 การสร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดโคอินทิเกรต (Cointegrate vector) โดยตัดยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิด Ti มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pBR322 โคลนยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปในบริเวณ T-DNA ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด Ti จะเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันของยีนส่วนที่เหมือนกันของ T-DNA ทำให้ได้พลาสมิด Ti ใหม่ซึ่งมียีนที่ต้องการถ่ายโอนสอดแทรกอยู่ (Watson และคณะ, 1975)

2. ชนิดไบนารี (binary vector) (สุรินทร์ ปิยะโชคคณานุกูล, 2539; Raven และคณะ, 1992) พลาสมิดพาหะชนิดนี้เกิดจากการนำยีนส่วน T-DNAของพลาสมิด Ti มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะชนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E. coli* และใน *A. tumefaciens* ภายในยีนส่วนT-DNA มีตำแหน่งจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งสามารถตัดและสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปได้ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดพาหะชนิดนี้เมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิดดัดแปลง Ti คือมีกลุ่มยีน *vir* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ตัดยีนส่วน T-DNA ออกจากพลาสมิด Ti และทำให้ยีนส่วน T-DNA สามารถสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืชได้ แต่ไม่มียีนส่วน T-DNA รีคอมบิแนนท์พลาสมิดจะสามารถอยู่ร่วมกับพลาสมิดดัดแปลง Ti นี้ได้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิดทั้งสองนี้อยู่ร่วมกันเมื่อเข้าสู่เซลล์พืชจะสามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนที่ต้องการถ่ายโอนสอดแทรกอยู่เข้าไปในโครโมโซมของพืชได้ ดังแสดงในภาพที่ 1.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1.5 การสร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดไบนารี (Binary vector) โดยตัดยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิด Ti มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *A. tumefaciens* สร้างเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปในบริเวณ T-DNA ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* แต่ไม่มียีนส่วน T-DNA พลาสมิดทั้งสองสามารถอยู่ร่วมกันได้ (Revan และคณะ, 1992)

บีตา-กลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase ; GUS) เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการรายงานผลการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เนื่องจากกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส (GUS activity) สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และพืชส่วนมากไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ ผลที่ได้จึงมีความถูกต้องสูง การวิเคราะห์กิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดส (GUS assay) สามารถทำได้ 3 วิธี คือ histochemical assay , spectrophotometric assay และ fluorometric assay โดยสารตั้งต้นที่ใช้ได้แก่ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิลบีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide; X-Gluc) พารา-ไนโตรฟีนิลบีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ (ρ -nitrophenyl β-D-glucuronide; PNPG) 4-เมธิลอัมเบลลิเฟอริลบีตา-ดี-กลูคูโรไนด์ (4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide; MUG) หรือ รีโซรูฟินกลูคูโรไนด์ (resorufin glucuronide) (Gallagher, 1992)

Jefferson และคณะ (1997) ได้รายงานการใช้ยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส (ยีน *gus*) จาก *E. coli* เป็นยีนรายงานผล (reporter gene) เป็นครั้งแรก เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในพืชดัดแปลงพันธุ์โดยเชื่อมยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสไว้ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ชนิด cauliflower mosaic virus (CaMV) 35s หรือภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีนประมวลรหัสไรบูโรสบิสฟอสเฟตคาร์บอกซิเลส (riburose bisphosphate carboxylase; *rbcS*) หน่วยย่อยเล็ก (small subunit) แล้วถ่ายโอนเข้าพืช วิเคราะห์กิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสโดยวิธี fluorometric assay ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงและใช้เนื้อเยื่อของพืชดัดแปลงพันธุ์จำนวนน้อย พบว่าพืชดัดแปลงพันธุ์ที่มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสมีลักษณะปกติ แข็งแรง สืบพันธุ์ได้ กิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสมีความคงทนมาก น้ำสกัดจากเนื้อเยื่อพืชที่เก็บไว้เป็นเวลานานๆยังคงมีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสในปริมาณสูง

ก่อนหน้านี้มีรายงานการใช้ยีนต่อไปนี้เป็นยีนรายงานผล เช่น ยีนประมวลรหัสโนพาลีนซินเทส (nopaline synthase) จาก *A. tumefaciens* (Bevan และคณะ, 1983) ยีนประมวลรหัสออกโทพีนซินเทส (octopine synthase) จาก *A. tumefaciens* (Herrera-Estrella และคณะ, 1983) และยีนประมวลรหัสบีตา-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) จาก *E. coli* (Jefferson และคณะ, 1987) แต่พบว่าพืชชั้นสูงมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ จึงทำให้การวิเคราะห์และการระบุตำแหน่งการแสดงออกของยีนทำได้ยาก นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ยีนประมวลรหัสคลอแรมเฟนิคอลอะซิทิลทรานสเฟอเรส (chloramphenicol acetyl transferase; *cat*) (Herrera-Estrella และคณะ, 1983) ยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II(neomycin phosphotransferase; *npt* II) หรือยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin resistant gene) (Bevan และคณะ, 1983) และยีน

ประมวลรหัสลูซิเฟอเรส (luciferase) (Ow และคณะ, 1986) เป็นยีนรายงานผล แต่การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ทำได้ยาก จึงไม่เป็นที่นิยมเท่ากับยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส

Hood และคณะ (1986) ได้สร้าง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* แต่ไม่มีส่วน T-DNA เรียกพลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pEHA101

Kimura และคณะ (1993) ทำการสร้างพลาสมิด pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดไบนารี ซึ่งมียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน เป็นยีนคัดเลือก มียีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสเป็นยีนรายงานผล อยู่ในบริเวณส่วน T-DNA พลาสมิด pBIH1-IG นี้เมื่อนำมาสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายโอนยีนสอดแทรกในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เข้าสู่โครโมโซมของ *Arabidopsis thaliana* และข้าว (Hiei และคณะ, 1994)

Töpfer และคณะ (1988) ทำการศึกษาเปรียบเทียบความไว (sensitivity)ของการรายงานผลของยีนรายงานผล 3 ชนิด คือ ยีนประมวลรหัสคลอแรมเฟนิคอลอะซิทิลทรานสเฟอเรส ยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II และ ยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ชนิด cauliflower mosaic virus 35s ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่โปรโตพลาสของต้นยาสูบ โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* พบว่าลำดับความไวในการรายงานผลเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส , ยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II และ ยีนประมวลรหัสคลอแรมเฟนิคอลอะซิทิลทรานสเฟอเรส ตามลำดับ

Babic และคณะ (1998) ทำการดัดแปลงพันธุ์ *Brassica carinata* โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* ชิ้นส่วนพืช (explant) ที่ใช้คือ cotyledonary petiole และ hypocotyl พลาสมิดพาหะที่ใช้มียีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอร์เรส II และยีนประมวลรหัสฟอสฟิโนธริซินเอซิลทรานสเฟอเรส (phosphinothricin acyltransferase) เป็นยีนคัดเลือก (selectable marker gene) และมียีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสเป็นยีนรายงานผล ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ชนิด cauliflower mosaic virus 35s พบว่า cotyledonary petioles ให้ผลการถ่ายโอนยีนดีที่สุด โดย 30 – 50 เปอร์เซ็นต์ ของ explant ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีกานามัยซินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นที่มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส

Hatanaka และคณะ (1999) ทำการดัดแปลงพันธุ์ต้นกาแฟ (*Coffea canephora*) โดยการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ embryogenic callus ที่ได้จาก leaf explant โดยวิธีการใช้ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิดพาหะ pIG121-Hm ซึ่งมียีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสเป็นยีนรายงานผล ยีนประมวลรหัสไฮโกรมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส (hygromycin phosphotransferase; *hpt*) หรือยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (hygromycin resistant gene) ยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II เป็นยีนคัดเลือก คัดเลือกแคลลัส (callus) ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนจากความสามารถเจริญในอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน พบว่าต้นอ่อนสมบูรณ์ที่พัฒนาจาก embryogenic callus ซึ่งสามารถเจริญบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซินและกานามัยซินเข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสสูงในใบและราก

Polowick และคณะ (2000) ทำการดัดแปลงพันธุ์ต้นถั่วโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* ชิ้นส่วนพืช (explant) ที่ใช้คือ เอ็มบริโอ (embryo) ตัดเป็นชิ้นบางๆเพื่อศึกษาว่าวิธีการดัดแปลงพันธุ์นี้สามารถใช้ได้กับถั่วทั้ง 7 จีโนไทป์ที่ทดสอบหรือไม่ ใช้พลาสมิดพาหะของ *A. tumefaciens* 3 ชนิด ที่มียีนคัดเลือกแตกต่างกัน คือยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II ยีนประมวลรหัสฟอสฟิโนธริซินเอ็นอะซิทิลทรานสเฟอเรส (phosphinothricin *N*-acetyltransferase; *pat*) หรือยีนประมวลรหัสอะซิโตไฮดรอกซีแอซิดซินเทส (acetohydroxy acid synthase) ทุกพลาสมิดพาหะมียีนประมวลรหัสบีตา- กลูคูโรนิเดสเป็นยีนรายงานผล ผลการถ่ายโอนยีน 39 ครั้ง ได้พืชดัดแปลงพันธุ์ 323 ต้นจากทุกจีโนไทป์และทุกชนิดของยีนคัดเลือกที่ใช้ทดสอบ แต่มิใช่ทุกจีโนไทป์จะได้จากทุกชนิดของยีนคัดเลือกที่ใช้ทดสอบ ค่าความถี่ของการเป็นพืชดัดแปลงพันธุ์ (transgenic frequency) เท่ากับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ยีนที่สอดแทรกเข้าไปแสดงออกและถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล และพบว่าพืชดัดแปลงพันธุ์ที่คัดเลือกได้บนอาหารที่มีกานามัยซิน โดยทั่วไปจะมีกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสสูงกว่าพืชดัดแปลงพันธุ์ที่คัดเลือกได้บนอาหารที่มีแอล-ฟอสฟิโนธริซิน หรือบนอาหารที่มีคลอซัลฟูรอน กิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสในใบของพืชดัดแปลงพันธุ์รุ่นแรกแต่ละต้นจะแตกต่างกัน ส่วนกิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสในพืชดัดแปลงพันธุ์รุ่นที่สองจะสอดคล้องกับของพืชดัดแปลงพันธุ์รุ่นแรก

Chabaud และคณะ (1988) ศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน (transformation efficiency) โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* เข้าสู่พืช alfafa พบว่าชนิดของ explant ที่ใช้คือใช้เนื้อเยื่อใบ (leaf tissue) จะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เนื้อเยื่อจาก petiole เนื่องจากสามารถทำให้เกิดบาดแผลง่ายกว่าส่งผลให้ *A. tumefaciens* บุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ตัวแปรที่สองคือสายพันธุ์ *A. tumefaciens* ซึ่ง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ

A. tumefaciens สายพันธุ์ A281 เนื่องจากมีความรุนแรงในการบุกรุกที่จำเพาะกับพืช alfafa และแคลลัสที่ถูกบุกรุกด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A281 นี้เมื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถเจริญเป็นเอ็มบริโอได้ สอดคล้องกับที่มีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ตัวแปรที่สาม ระยะเวลาในการ cocultivation โดยประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีนจะสูงที่สุดเมื่อทำการ cocultivation เป็นเวลา 4 วัน เนื่องจากพบว่าความเข้มข้นของเซลล์ของ *A. tumefaciens* หลังการ cocultivation เป็นเวลา 4 วัน มากกว่าหลังการ cocultivation เป็นเวลา 2 และ 3 วัน ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มโอกาสของการถ่ายโอนยีน แต่ทั้งนี้ต้องควบคุมปริมาณเชื้อ *A. tumefaciens* ไม่ให้มีการเจริญมากเกินไป (overgrowth) เพราะจะทำให้เนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย ที่ภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการถ่ายโอนยีน ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนมีค่ามากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

Godwin และคณะ (1991) ศึกษาผลของอะซิโตไซริงโอน และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการถ่ายโอนยีนของ *A. tumefaciens* เข้าสู่พืช 5 ชนิด คือ *Allium cepa*, *Antirrhinum majus*, *Brassica campestris*, *Glycine max* และ *Nicotiana tabacum* พบว่าการเติมอะซิโตไซริงโอน ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ จะเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ N2/73 และสายพันธุ์ A281 ส่วน *A. tumefaciens* สายพันธุ์ Ach5 จะมีความรุนแรงต่อพืช *N. tabacum* เมื่อไม่เติมอะซิโตไซริงโอน ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าอะซิโตไซริงโอนนอกจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน ยังอาจยับยั้งความรุนแรงของ *A. tumefaciens* บางสายพันธุ์ที่จำเพาะกับพืชบางพันธุ์ได้ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการ cocultivation จะมีผลต่อการเกิดก้อนเนื้องอกของเซลล์พืช แต่ไม่มีความสำคัญต่อความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ *A. tumefaciens* กับพันธุ์พืชในการทดลอง

อะซิโตไซริงโอน (acetosyringone) จัดเป็นสารประกอบ phenolic ซึ่งเป็นสารพิษที่พืชปล่อยออกมาเมื่อมีบาดแผลเพื่อป้องกันการติดเชื้อจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ แต่มีผู้ศึกษาพบว่าสารอะซิโตไซริงโอนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการส่ง T-DNA บนพลาสมิด Ti จาก *A. tumefaciens* เข้าไปในเซลล์พืชซึ่งจะควบคุมโดยกลุ่มยีน virulence (*vir*) ที่ประกอบด้วยยีน *vir* A , *vir* B , *vir* C , *vir* D , *vir* E และ *vir* G ที่อยู่ในพลาสมิด Ti โดยเมื่อพืชสังเคราะห์สารอะซิโตไซริงโอนแล้วปล่อยเข้าสู่เซลล์ของ *A. tumefaciens* โปรตีนจากยีน *vir* A มีการจดจำสารอะซิโตไซริงโอนได้จะร่วมกันไปกระตุ้นยีน *vir* G ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นให้มีการถอดรหัสของยีนอื่นๆในกลุ่มให้ทำงาน เกิดการถอดรหัสของยีน *vir* ที่เหลือ โปรตีนจากยีน *vir* D ซึ่งเป็นเอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) จะทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่งขอบเขตทางซ้าย (left border) และขอบเขตทางขวา (right border) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีลำดับเบสซ้ำกันบน T-DNA ได้ T-DNA สายเดี่ยว จากนั้นมีการส่ง T-DNA สายเดี่ยวผ่าน

เข้าไปในเซลล์และแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ส่วนโปรตีนจากยีน *vir* E ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อให้มีความคงตัวในระหว่างและหลังจากที่มีการถ่ายโอนยีน

Jame และคณะ (1993) ศึกษาผลของอะซิโตไซริงโอนและบีเทนฟอสเฟตต่อประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ C58C1::pGV3850 ที่มีพลาสมิด pKIWI105 ซึ่งมียีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส เป็นยีนรายงานผล พบว่าการเติมอะซิโตไซริงโอน 0.1 มิลลิโมลาร์ และบีเทนฟอสเฟต 1 มิลลิโมลาร์พร้อมกันในขั้นตอน cocultivation กิจกรรมของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส ที่ตรวจพบจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการเติมอะซิโตไซริงโอน หรือบีเทนฟอสเฟตเพียงอย่างเดียวหรือไม่เติมเลย และยังพบอีกว่าการเลือกใช้อาหารเหลว 2 ชนิดในขั้นตอน cocultivation คือ Simpified induction medium และ Murashige Shoog medium ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ทดสอบ

Rashid และคณะ (1996) ได้พัฒนาวิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121Hm ซึ่งประกอบด้วยยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสและยีนประมวลรหัสไฮโกรมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์จากความสามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเติมอะซิโตไซริงโอน 50 ไมโครโมลาร์ในขั้นตอน cocultivation จะเพิ่มความสำเร็จในการถ่ายโอนยีน ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนมีค่าเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงเท่าๆกับประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ *Japonica* ที่มีรายงานไว้ และเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่อื่น พืชทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มีลักษณะปกติ แข็งแรง และสามารถสืบพันธุ์ได้ ทำการยืนยันการถ่ายโอนยีนเข้าสู่จีโนมของพืชทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธี Southern blot analysis และพบว่ายีนทั้งสองชนิดสามารถถ่ายทอดและแสดงออกในรุ่นลูก (R1) ได้ ตามกฎของเมนเดล

Otani และคณะ (1993) สร้างมันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) ดัดแปลงพันธุ์โดยวิธีการใช้ *A. rhizogenes* ที่มีพลาสมิด pBI121 ซึ่งมียีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II และยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส ใช้ชิ้นส่วนใบ (leaf disks) เป็นชิ้นส่วนพืชในขั้น cocultivation ผลการศึกษาพบว่า *A. rhizogenes* ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ทดสอบไม่พบความแตกต่างในการถ่ายโอนยีน ต้นมันเทศทรานสฟอร์แมนท์มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II และยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส แต่พบความผิดปกติของลักษณะทางจีโนไทป์

Otani และคณะ (1996) สร้าง *Ipomoea trichocarpa* Ell ดัดแปลงพันธุ์ โดยวิธีการใช้ *A. rhizogenes* 10 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pBI121 ซึ่งมียีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II และยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส และใช้ cotyledon explant เป็นชิ้นส่วนพืชในขั้น cocultivation พบว่าไม่มีความแตกต่างในความสามารถที่ทำให้ cotyledon explant เกิดรากบริเวณเซลล์พืชที่มีการบุกรุก (rhizogenicity) ของ *A. rhizogenes* ทั้ง10 สายพันธุ์ที่ทดสอบ พืชทรานสฟอร์แมนท์มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสนีโอมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II และยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส และสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้ตามกฎของเมนเดล แต่พบความผิดปกติของลักษณะทางจีโนไทป์ของต้นทรานสฟอร์แมนท์เมื่อเปรียบเทียบกับพืชพันธุ์เดิม และมีความแตกต่างของลักษณะดอกเมื่อทำการถ่ายโอนยีนด้วย *A. rhizogenes* ต่างสายพันธุ์

Otani และคณะ (1998) ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่มันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pIG121-Hm และได้รายงานปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส บน embryogenic callus ไว้ 3 ปัจจัยคือ การเติมอะซิโตไซริงโอน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ embryogenic callus อายุ 14 วันในขั้น cocultivation และสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้ พบว่าปัจจัยที่ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนแตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 101 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการถ่ายโอนยีน สอดคล้องกับผลการทดลองซึ่ง Gama และคณะได้รายงานไว้ในปี 1996 พืชทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มีลักษณะปกติ แข็งแรง

Mori และคณะ (1999) ได้รายงานว่า septum ของผักบุ้งเป็นชิ้นส่วนพืช (explant) ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ แต่เนื่องจากที่ septum ของผักบุ้งมีหน่อที่จะพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้อยู่แล้ว จึงทำให้การแยกต้นอ่อนที่พัฒนามาจาก septum explant หรือจากหน่อที่ septum ออกจากกันทำได้ยาก

ต่อมา Akaracharanya และคณะ (2001) ได้ศึกษาชนิดของชิ้นส่วนผักบุ้ง (explant) ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ และรายงานว่า cotyledon explant ของผักบุ้งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ และรายงานว่าเมื่อใช้ไธเดียซูรอน (thidiazuron; TDZ) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นฮอร์โมนเร่งการพัฒนาเป็นต้น cotyledon explant ที่มาจากต้นอ่อนอายุ 7 วัน ให้ค่าความถี่ของการงอกต้นสูงสุดคือ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ cotyledon explant ที่มาจากต้นอ่อนอายุ 4 และ 14 วัน ซึ่งให้ค่าความถี่ของการงอกต้นเท่ากับ 33 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับไธเดียซูรอนเร่งการพัฒนาของ cotyledon explant ไปเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่า 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน

(6-benzylaminopurine) และไอโซเพนทินิลอะดีนีน (isopentenyl adenine) เมื่อใช้ cotyledon explant ที่มาจากต้นอ่อนอายุ 7 วัน แต่ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนเร่งการพัฒนาของ cotyledon explant ไปเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าไธเดียซูรอนเมื่อใช้ cotyledon explant ที่มาจากต้นอ่อนอายุ 14 วัน การใช้กรดอินโดล-3-บิวทีริก (indole-3-butyric acid) ร่วมกับไธเดียซูรอน 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีนหรือไอโซเพนทินิลอะดีนีน ไม่ทำให้ค่าความถี่ของการพัฒนาไปเป็นต้นเพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้งในรูป cotyledon explant โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งมียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นยีนคัดเลือก และมียีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสเป็นยีนรายงานผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย