การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) via *Agrobacterium*

กุลชาต นาคจันทึก[1] บุบผา คงสมัย[1,2] และสนธิชัย จันทร์เปรม[1,2]

Kulachart Nakchantuk,[1] Buppa Kongsamai[1,2] and Sontichai Chanprame[1,2]

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*, Crantz.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPS1304 ที่มียีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (*aroA*) และยีนรายงานผล *gus* โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ เวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) 15, 30, 45 และ 60 นาที กับการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับเนื้อเยื่อ (co-cultivation) 1, 3 และ 5 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่า วิธีการที่ให้ผลดีที่สุดคือ การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะและกระตุ้นเชื้อโดยใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ร่วมกับการปลูกเชื้อนาน 60 นาที และเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งทำให้เนื้อเยื่อทุกชิ้นได้รับการถ่ายยีนและมีค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีน้ำเงินจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS hitochemical assay หลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 7 วัน สูงสุด 9 คะแนนจากค่าคะแนนเต็ม 10 ส่วนแคลลัสของมันสำปะหลังที่ปลูกเชื้อนาน 30 นาที และเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเนื้อเยื่อทุกชิ้นได้รับการถ่ายยีนและมีค่าเฉลี่ยคะแนนการติดสีน้ำเงินสูงสุด 5 คะแนน หลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 14 วัน และหลังจากคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบแคลลัสจำนวน 8 ชิ้น สามารถเจริญเติบโตได้ และเมื่อตรวจสอบโดยวิธี PCR และ Southern PCR hybridization พบว่ามีการคงอยู่ของยีน *aroA* ในแคลลัสจำนวน 4 ชิ้น

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง, อะโกรแบคทีเรีย, ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช

Abstract

The parameters for *Agrobacterium*-mediated gene transferred into cassava, *Manihot esculenta* Crantz, were optimized for *Agrobacterium* strain EHA105, harboring the pCAM-EPSPS1304 containing glyphosate resistance gene (*aroA*) and *gus* reporter gene. Parameters were concurrently studied including 1) inoculation periods of 15, 30, 45 and 60 minutes, 2) co-cultivation periods of 1, 3 and 5

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Dept. of Agronomy Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart UniversityKamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 / ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และ การวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สกอ.

[2] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140 / AG-BIO/ PERDO-CHE

days. The GUS histochemical assay was performed on each explants after co-cultivation to determine transient expression of *gus* gene. The results demonstrated that the best result was obtained by using *A. tumefaciens* strain EHA105 activated by 100 mM acetosyringone, 60 min inoculation period and 5 days co-cultivation period. The results after transformation for 7 days using such technique revealed that 100% of tissue pieces were transformed and the GUS histochemical assay showed the highest score of 9 from 10. Whereas the inoculation time of 30 min combined with 3 days co-cultivation time gave 100% of transformed tissue with the highest GUS histochemical assay scored of 5 after 14 days of transformation. After selection on selective medium containing 5 μM glyphosate, 8 of putative transformed calli were obtained. However, the result of PCR analysis and Southern PCR hybridization for the transgenes revealed that 4 out of 8 pieces contained *aroA* gene.

Keywords : *Manihot esculenta*, Crantz., *Agrobacterium tumefaciens*, *aroA*, *EPSPS* gene

E-mail : taam5626@hotmail.com

คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และ มันฝรั่ง ปัจจุบันมีการเพิ่มการใช้มันสำปะหลังในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนและอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่น ๆ ทำให้แนวโน้มการปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทยเพิ่มขึ้น โดยในปี 2552 พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทยสูงถึง 8,292,146 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) แต่ปัญหาในการปลูกมันสำปะหลังนอกจากสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน โรค และ แมลงที่เข้าทำลายแล้ว วัชพืชก็ถือเป็นอุปสรรคสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของมันสำปะหลัง ถ้าการควบคุมวัชพืชในแปลงมันสำปะหลังไม่ดีจะทำให้ผลผลิตลดลงมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Leihner, 2002) เกษตรกรส่วนใหญ่จะใช้สารกำจัดวัชพืชจำพวกไม่เลือกทำลาย เช่น ไกลโฟเสท และกลูโฟซิเนท ในการแก้ปัญหาวัชพืช ซึ่งการทำงานของไกลโฟเสทนั้น จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enoylpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase (EPSPS) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้าง aromatic amino acid ในพืช (นิรนาม, 2549) แต่ปัญหาของมันสำปะหลังเกี่ยวกับการกำจัดวัชพืชนี้คือ ต้นมันสำปะหลังที่ยังเล็กจะตายหรือชะงักการเจริญเติบโตเมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืช ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มันสำปะหลังมีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช จะช่วยทำให้การกำจัดวัชพืชของเกษตรกรมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และลดความสูญเสียผลผลิตมันสำปะหลังได้อีกด้วย

ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลังช่วยให้การทดสอบสารต่างๆ ในเบื้องต้นทำได้ง่ายขึ้น โดยใช้ตุ้มใบอ่อน (immature leaflobe) โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินลงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เป็นสูตรพื้นฐาน จะทำให้เกิด somatic embryo ได้ (Stamp and Henshaw, 1987; Szabados *et al*., 1987) ซึ่งยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (Raemakers *et al*., 1993) ส่วน Arnaud and Sailland (1998) ได้ทดลองถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทโดยวิธีใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียให้กับยาสูบ 3 สายพันธุ์ คือ HR WR และ S ซึ่งอ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืช พบว่า สายพันธุ์ HR ที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานได้รับผลกระทบจากสารไกลโฟเสทเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ WR และ S ไม่ว่าจะใช้ไกลโฟเสท 800 หรือ 1600 กรัม/เฮกตาร์ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังและสร้างมันสำปะหลังดัดแปรพันธุกรรมที่มียีนต้านทานและแสดงลักษณะต้านทานต่อสารกำจัดไกลโฟเสทโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะสำหรับการถ่ายยีน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมพืชที่ใช้ในการทดลอง

นำส่วนลำต้นมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 มาทำความสะอาดด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 0.6% เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นตัดผิวนอกของส่วนยอดหรือตานำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร CM (Taylor *et al*, 2001)(สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร, $CuSO_4$ 2 ไมโครโมลาร์, BA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร, GA_3 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ phytagel 2 กรัมต่อลิตร) เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ ในสูตรอาหาร CM เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

การถ่ายยีน

ใช้ใบมีดตัดชิ้นส่วนของแคลลัสขนาด 0.5 ตารางมิลลิเมตรวางลงในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่มีสีเขียวอ่อนสม่ำเสมอ ใช้ใบมีดที่คมกรีดให้เป็นรอยแผล แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มี พลาสมิด pCAM-EPSPS 1304 ซึ่งมียีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (*aroA*) และยีนรายงานผล *gus* โดยใช้ความเข้มข้นเชื้อต่ออาหารเหลวสูตร CM 1:50 (OD_{560}=1.2) และใส่ร่วมกับ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ปิดฝา เขย่าเบา ๆ ทิ้งไว้ 15 30 45 และ 60 นาที วางชิ้นแคลลัสลงบนกระดาษซับที่ปลอดเชื้อเพื่อซับเอาแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 0 1 3 และ 5 วัน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร MS ที่เติม BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารไกลโฟเสทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson *et al.,* 1987)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay

นำชิ้นเนื้อเยื่อมันสำปะหลังที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวในเนื้อเยื่อพืชตามวิธีของ Jefferson (1987) โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อ มาแช่ในสารละลาย X-gluc solution mix (0.1 M $NaPO_4$ buffer, 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferriccyanide, 0.5 mM potassium ferroccyanide, 1.0 mM X-Glucuronide และ 0.1%TritonX-100) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นเนื้อเยื่อมาตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ บันทึกเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินและให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน โดยมีเกณฑ์คือ 0-10 คะแนน ตั้งแต่ 1 คะแนนขึ้นไป ช่วงห่างแต่ละคะแนนเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 3 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's New Mulitple Range Test (DMRT)

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

สกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนเมื่อผ่านการคัดเลือกแล้ว 4-6 สัปดาห์ โดยใช้วิธี CTAB (Aldrich and Cullis, 1993) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *aroA* โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้

Forward – 5' CCATTCCGCTCGAGATGGCACAAATTAACAACATGGC 3'

Reverse – 5' ATCCACCGCTCGAGCGGTCATCAGGCAGCCTTCGTAT 3'

โดยขั้นตอนแรก ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามลำดับ และขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดตรวจสอบผลโดยวิธี gel electrophoresis ใน agrose gel 0.8 %

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลัง โดยเทคนิค Southern PCR hybridization

ย้ายดีเอ็นเอจากการทำ electrophoresis ไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N^+ บริษัท Amersham) ผึ่งไนลอนเมมเบรนให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอนเมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันในสารละลาย hybridization ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ไนลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) คือยีน *aroA* ที่ติดสลากด้วย DIG ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งที่มีเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย hybridization 1 มิลลิลิตรในหลอดดังกล่าว นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดเติมลงในหลอด hybridization ที่มีไนลอนเมมเบรนอยู่เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization นำไนลอนเมมเบรนไปประกบแผ่นฟิล์มโดยทำในห้องมืดนาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดจึงล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer แล้วตรวจดูภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

ผลและวิจารณ์

การถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens*

ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ (inoculation) มีผลต่อความสำเร็จในการถ่ายยีน เนื่องจากเป็นช่วงที่ช่วยทำให้เชื้อยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืชได้ (Yong *et al.*, 2006) ซึ่งจากการถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชเข้าสู่มันสำปะหลังด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มี พลาสมิด pCAM-EPSPS1304 ในการทดลองพบว่าหลังจากการถ่ายยีนแล้วเป็นเวลา 7 วัน เมื่อสุ่มนำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีนมาจำนวน 25% เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* แบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay ได้เนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินดีที่สุดในขั้นตอนปลูกเชื้อที่ใช้ระยะเวลา 60 นาที และใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งได้คะแนนพื้นที่การติดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงถึง 9 คะแนนจากคะแนนเต็ม 10 แต่เมื่อสุ่มเอาเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วเป็นเวลา 14 วัน มาตรวจสอบ พบว่าการปลูกเชื้อที่ 30 นาที และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วันให้ผลดีที่สุดคือ ได้เนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุดเป็นคะแนน 5 คะแนน (ตารางที่ 1) ซึ่งจากรายงาน

ของ Wu *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อนาน 0 0.25 0.5 1 2 3 และ 5 ชม. พบว่า เมื่อระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานขึ้นการแสดงออกของยีน *gus* สูงขึ้น ซึ่งการปลูกเชื้อนาน 5 ชม. พบการแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ระยะเวลานานเกินไปเนื้อเยื่อพืชจะถูกทำลายโดยเชื้อ *A. tumefaciens* มากขึ้น ทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นและอัตราการรอดชีวิตลดลง

เมื่อสังเกตปัจจัยระยะเวลาในการบ่มเชื้อกับแคลลัสมันสำปะหลังที่ระดับต่าง ๆ พบว่า เมื่อตรวจสอบที่ 7 และ 14 วันหลังจากทำการถ่ายยีน จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อแคลลัสไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า Pr>0.05 คือ 0.3969 และ 0.1919 ตามลำดับ(ตารางที่ 1) ส่วนระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ ที่ 7 วันหลังจากทำการถ่ายยีน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จะได้ค่าคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 8.3 โดยค่า Pr<0.05 คือ <0.0001 ส่วนที่ 14 วันหลังจากทำการถ่ายยีน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ได้คะแนนเฉลี่ยการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 3.3 โดยค่า Pr<0.05 คือ 0.0049

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างขั้นตอนการบ่มเชื้อกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า Pr<0.05 คือ 0.0032 และ 0.018 ตามลำดับ โดยการปลูกเชื้อ 60 และ 30 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ 5 และ 3 วัน มีค่าเฉลี่ยการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแคลลัสเป็น 9.0 และ 5.0 ภายหลังการถ่ายยีน 7 และ 14 วันตามลำดับ (ตารางที่ 1)

จากการสังเกตพบว่าหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 7 วัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อนาน 5 วัน คะแนนเฉลี่ยจะอยู่ที่ 8.33 ซึ่งถือว่ามากที่สุด แต่เมื่อระยะเวลาหลังจากการถ่ายยีนเพิ่มเป็น 14 วัน คะแนนเฉลี่ยกลับลดลงเหลือ 2.0 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการถ่ายยีนเข้าสู่มันสำปะหลังนั้น ยีนที่ถูกส่งผ่านเข้าไปในเซลล์พืชไม่ได้เข้าไปรวมตัวกับจีโนมพืช จึงทำให้บางส่วนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ nuclease ที่อยู่ภายในเซลล์พืชได้ง่าย (Cooper, 2000) ทำให้การแสดงออกของยีนรายงานผลลดลงเมื่อระยะเวลานานขึ้น

ตารางที่ 1 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการปลูกเชื้อ (inoculation) กับการเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ที่มีต่อการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus*

	7 วันหลังถ่ายยีน					14 วันหลังถ่ายยีน				
ino(minutes)/ co(days)	15	30	45	60	mean (co)	15	30	45	60	mean (co)
0	0 f[1/]	0 f	0 f	0 f	0	-	-	-	-	-
1	2.3 e	0.67 f	3.67 e	0.67 f	1.8	-	-	-	-	-
3	5.67 d	7.0 cd	6.3 cd	5.67 cd	6.2	3.0 b	5.0 a	3.0 b	2.3 bc	3.3
5	8.3 ab	8.3 ab	7.67 abc	9.0 a	8.3	1.0 c	1.7 bc	2.3 bc	3.0 b	2
mean (ino)	4.1	4.0	4.4	3.8		2.0	3.3	2.7	2.7	
Pr<0.05	0.3969 (ino)	<0.0001 (co)	0.0032 (ino*co)	**<0.0001 (trt)**		0.1919 (ino)	0.0049 (co)	0.0188 (ino*co)	**0.0084 (trt)**	
%CV					20.61					37.5

[1/] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Southern PCR hybridization

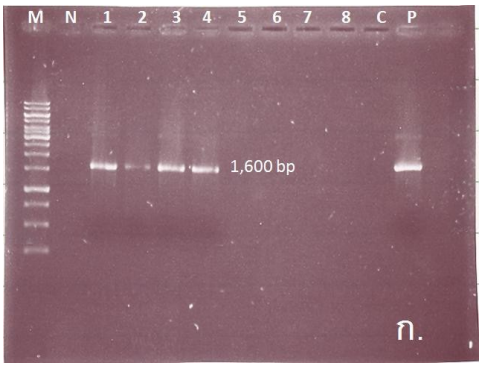
จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *aroA* ในมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 8 ตัวอย่าง ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก พบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีขนาด 1,600 คู่เบส จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ ก) ทั้งนี้พบว่าแคลลัสมันสำปะหลังบางชิ้นเมื่อตรวจสอบเบื้องต้นมีการแสดงออกของยีน *gus* โดยเกิดสีน้ำเงินขึ้นที่แคลลัส แต่เมื่อนำมาตรวจสอบความคงอยู่ของยีน *aroA* ด้วยวิธี PCR แล้วไม่พบยีน *aroA* นั้นอาจเนื่องมาจากการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้น กระบวนการส่งถ่ายและแทรกตัวของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืชนั้นมักนำส่วน right border เข้าสู่จีโนมพืชก่อน (Sheng and Citovsky, 1996) และพลาสมิด pCAM-EPSPS 1304 ที่ใช้ในการทดลองนี้มียีน *gus* เป็นยีนที่อยู่บริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งเป็นด้านที่ย้ายเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซมของเซลล์พืชก่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าส่วนของยีน *aroA* ที่อยู่ทางด้าน left border ของ T-DNA อาจเกิดการขาดหายไประหว่างการถ่ายยีน จึงทำให้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay แล้วเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงิน แต่เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจสอบหายีน *aroA* ด้วยวิธี PCR กลับไม่พบยีนดังกล่าว

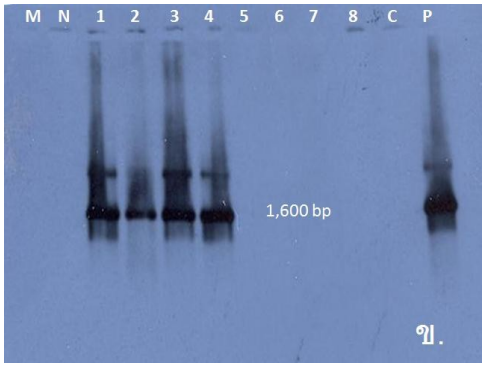
สำหรับกรณีที่บางแคลลัสที่มียีน *gus* เพียงยีนเดียว แต่ยังสามารถเจริญและพัฒนาเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือกที่มีสารไกลโฟเสทได้ อาจเนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้แคลลัสที่มีความหนาพอควร จึงอาจมีเนื้อเยื่อบางส่วนไม่สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ดังนั้นความเข้มข้นของสารไกลโฟเสทที่เคลื่อนย้ายเข้าไปในส่วนบนของเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจเจือจางลง ทำให้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมด เซลล์ปกติจึงเจริญขึ้นมาได้บนอาหารคัดเลือก หรืออาจเกิดจากการที่แคลลัสดังกล่าวมีลักษณะเป็น chimera คือ ในแคลลัสที่พัฒนาขึ้นใหม่มีเซลล์บางส่วนมียีนที่ถูกถ่ายเข้าไปปะปนอยู่กับเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้แคลลัสสามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือก ซึ่งการเกิดลักษณะดังกล่าวนี้ Zhong *et al.* (1996) รายงานว่าในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่นำเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนนั้น ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า chimera ได้มาก ซึ่งจัดเป็นปัญหาหลักของการถ่ายยีน การเลือกใช้เนื้อเยื่อชนิดนี้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนจึงมีข้อจำกัด จึงมักใช้ในกรณีที่การชักนำให้เกิดยอดจากเซลล์หรือจากแคลลัสทำได้ยากเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามปัญหาการเกิด chimera สามารถแก้ไขได้โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ในระยะเวลาที่สั้นลง เพื่อชักนำให้ได้ยอดจำนวนมากและรวดเร็ว เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะได้ยอดที่ไม่เป็น chimera แล้วคัดเลือกยอดที่ได้บนอาหารคัดเลือกซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *aroA* ด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization โดยการไฮบริไดซ์ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *aroA* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin (DIG) พบว่า เกิดแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มตรงกับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ของยีน *aroA* ซึ่งตรงกันกับดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ใช้ คือ พลาสมิด pCAM-EPSPS 1304 และไม่พบแถบสีดำในตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและน้ำกลั่น (ภาพที่ ข) จึงเป็นการยืนยันซ้ำว่ายีนที่ตรวจพบด้วยวิธี PCR เป็นยีน *aroA* จริงและอาจสามารถสอดแทรกเข้าไปรวมตัวกับจีโนมของมันสำปะหลังได้ ซึ่งจะต้องมีการตรวจสอบโดยวิธี Southern hybridization โดยใช้จีโนมิคดีเอ็นเอต่อไป

สรุป

มันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPS 1304 และยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท พบว่า การปลูกเชื้อนาน 60 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จะได้ผลการถ่ายยีนโดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผลแบบชั่วคราวด้วย

วิธี GUS histochemical assay เมื่อตรวจสอบที่เวลา 7 วันหลังการถ่ายยีนดีที่สุด แต่เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าการแสดงออกของยีนรายงานผลลดลงและ พบว่าการปลูกเชื้อนาน 30 นาที ร่วมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน กลับได้ผลการตรวจสอบสูงกว่า และการใช้เทคนิคการถ่ายยีนดังกล่าวสามารถถ่ายยีนให้กับแคลลัสมันสำปะหลังได้ โดยเมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ทั้งโดยวิธี PCR และ Southen PCR hybridization ในแคลลัสที่รอดชีวิตจากาการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท พบว่าจำนวนครึ่งหนึ่งของแคลลัสที่คัดเลือกไว้มียีนที่ถ่ายเข้าไปอยู่จริง





ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอของยีน *aroA* ขนาด 1,600 คู่เบส ที่ตรวจพบเมื่อใช้จีโนมิคดีเอ็นเอจากแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกนำมาทำปฏิกิริยา PCR (ก.) และแถบดังกล่าวให้สัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มจากการตรวจสอบโดยวิธี Southern PCR hybridization (ข.)

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (บริษัท Fermentas)

N = น้ำ (negative control)

C = ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

P = พลาสมิด pCAM-EPSPS 1304

1-8 = ดีเอ็นเอของแคลลัสมันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์การทดลองจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นิรนาม. 2549. สรุปการประเมินความปลอดภัยถั่วเหลือง 40-3-2 ที่ทนทานต่อยาปราบวัชพืช. แหล่งที่มา. www.biotec.or.th/biosafety/web/db/attach/radD39CC.pdf, 24 กรกฎาคม 2549.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจเกษตรปี 2552. แหล่งที่มา. http://www.oae.go.th, 3 สิงหาคม 2553.

Aldrich, K. J. and C.A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using Klen*Tag1* DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Mol. Biol. Rep**. 11: 128-141.

Arnaud, L. and A. Sailland. 1998. Physiological behavior of two tobacco lines expressing EPSP synthase resistant to glyphosate. **Pesticide Biochem. and Physiol.** 62: 27–39.

Cooper, G.M. 2000. The Cell: A Molecular Approach. Sinauer Associates, Inc., U.S.A. 689p.

Jefferson, R. A. 1987, T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions : *beta-glucuronidase* as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J.** 6: 3901-3907.

Leihner, D. 2002. Agronomy and cropping systems. In: R.J. Hillocks and J.M. Thresh (Eds.) Cassava: Biology, Production and Utilization, CABI, Oxon, pp. 91–113.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 437-497.

Raemakers, C.J.J.M., M. Amati, G. Staritsk, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 1993. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Ann. Bot. 71: 289–294.

Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence protein, will travel. **Plant cell.** 1699-1710.

Stamp, J.A. and Henshaw, G.G. 1987. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava. **Ann. Bot.** 59: 445–450.

Szabados, L., Hoyos, R. and Roca, W.M. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. **Plant Cell Rep.** 6: 248–251.

Taylor, N.J., M.V. Masona, R. Carcamo, T. Ho, C. Schöpke and C.M. Fauquet. 2001. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica** 120: 25–34.

Wu, H., C. Sparks, B. Amoah and H.D. Jones. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. **Plant Cell Rep.** 21: 659-668.

Yong, W.T.L., J.O. Abdullah and M. Mahood. 2006. Optimization of *Agrobacterium* – mediated transformation parameters for *Melastomatace* spp. Using *green fluorescent protein* (GFP) as a reporter. **Sci. Hort.** 109: 78-85.

Zhong, H., B. Sun, D. Warkentin, S. Zhang, R. Wu, T. Wu and M. B. Sticklen. 1996. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and ingerited expression of transgenes. **Plant Physiol.** 110: 1097-1107.