ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมของแคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13

Factors affecting *Agrobacterium*-mediated Transformation of Sugarcane Callus Kamphaengsaen 94-13

กุสุมา รอดแผ้วพาล[1] นงลักษณ์ เทียนเสรี[1,2] และสนธิชัย จันทร์เปรม[1,2]

Kusuma Rodpeawpan,[1] Nongluk Teinseree[1,2] and Sontichai Chanprame[1,2]

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนในอ้อยด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ในเบื้องต้นได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ได้แก่ ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและแคลลัสอ้อย พบว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA 105 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นในช่วง 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นต้นอ้อย และ การทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยทดสอบความเข้มข้นของเชื้อโดยการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่าง ๆ และระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนแคลลัสอ้อย ตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS histochemical assay โดยพิจารณาจำนวนชิ้นแคลลัสที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า การปลูกเชื้อโดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่ไม่เจือจางร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 88.33% และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับวิธีการอื่นที่ทดสอบ

คำสำคัญ : การถ่ายยีน เชื้ออะโกรแบคทีเรียม อ้อย

Abstract

Transformation of sugarcane via *Agrobacterium* is another easy and fast method for sugarcane improvement. In this preliminary study, factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency were studied including the concentration of cefotaxime on growth of *Agrobacterium tumefaciens* and sugarcane callus. It was found that cefotaxime at the concentration of 200 milligrams per liter could inhibit growth of *A. tumefaciens* strain EHA 105. Cefotaxime at any concentrations tested

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

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140/ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สกอ.

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

did not affect on growth and regeneration into plantlet of the callus. Another tested factor was the dilution of bacterial suspension combine with various inoculation duration. Transformation efficiency was determined by measuring transient expression of *uidA* gene in transformed callus using GUS histochemical assay. It was found that the bacteria suspension in the dilution ratio of 1:0 (bacterial suspension: liquid medium) in concerted with 10 minutes inoculation period gave the highest percentage of blue staining pieces, 88.33% and significantly different from other treatments.

Keywords : gene transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, sugarcane

E-mail : bow_biot@yahoo.com

คำนำ

อ้อยจัดเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก สำหรับในประเทศไทย ผลผลิตอ้อยถูกนำเข้าสู่โรงงานเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล นอกเหนือจากการใช้บริโภคภายในประเทศแล้วยังสามารถส่งออกไปต่างประเทศ และนำรายได้เข้าสู่ประเทศมีมูลค่าประมาณ 1,300 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2553) แต่ปัจจุบันการปลูกอ้อยของเกษตรกรไทยยังประสบปัญหาต่าง ๆ ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตอ้อยลดลง โดยวัชพืชนับเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งซึ่งส่งผลให้ผลผลิตของอ้อยลดต่ำลง หากไม่ใช้สารกำจัดวัชพืชผลผลิตจะลดลง 25-80% (พรชัย, 2551) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มผลผลิตอ้อยได้ และ การถ่ายยีนในอ้อยนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาอ้อยให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยวิธีที่นิยมกันก็คือ การใช้อะโกรแบคทีเรียม (Arencibia *et al*. 1998; Enriquez-Obregón *et al*. 1998; Manickavasagam *et al*. 2004) และการใช้เครื่องยิงอนุภาค (Xu *et al*. 2008; Jing-Sheng *et al*. 2008) ซึ่งการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม พบว่า มีปัจจัยหลายปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เช่น ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาถ่ายยีน สายพันธุ์เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ชนิดของพลาสมิด (Cheng *et al.* 2004) ระยะเวลาในการ co-cultivation ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สูตรอาหารสำหรับ inoculation และ co-cultivation อุณหภูมิและ สารปฏิชีวนะ (Cheng *et al.* 2004; Opabode, 2006) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนให้กับอ้อยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม เพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชให้กับอ้อยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

นำปลายยอดอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 อายุ 6-7 เดือน มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์ 10% และ 5% เติม Tween 20 1-2 หยด เขย่านาน 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกกาบใบออกจนเหลือใบม้วนชั้นในสุด ตัดเป็นชิ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10% โดยปริมาตร pH 5.7 (สูตรชักนำแคลลัส) เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 15 วัน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (ปัทมา, 2546)

การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสอ้อย

ตัดแคลลัสอ้อยให้เป็นชิ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร วางบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำแคลลัสร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้แคลลัส 15 ชิ้นในการทดลองแต่ละความเข้มข้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) ทำ 3 ซ้ำ เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและตรวจผลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้น (อาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 % โดยปริมาตร pH 5.7 (ปัทมา, 2546)) เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลการเกิดต้น

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 105 ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา16 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1 มิลลิลิตร (OD_{600} ~ 0.8-1) ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 1 มิลลิลิตร แล้วกวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 50 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ทุก 7 วัน จนครบ 14 วัน

การศึกษาความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อย

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *aroA* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร (OD_{600} ~ 0.8-1) เติมลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosynringone 200 ไมโครโมลาร์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัสเท่าปริมาตรเดิม แล้วกวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยไปเจือจางในอาหารเพาะเลี้ยงอ้อยในสัดส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 และ 1:100 จากนั้นเลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่เป็น compact callus ใช้ปากคีบบีบเบา ๆ ให้แคลลัสแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีเซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่าง ๆ ร่วมกับสาร acetocyringone 200 ไมโครโมลาร์ ปิดฝาเขย่าเบา ๆ นาน 10 20 30 และ 40 นาที ให้ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับเชื้ออย่างทั่วถึง ซับแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นแคลลัสด้วยกระดาษซับที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส ที่เติมสาร acetocyringone 200 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 3 วัน ล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่านาน 30 นาที จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร

ชักนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson,1987) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) มี 3 ซ้ำ โดยใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 20 ชิ้น บันทึกเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินและให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนแคลลัส (โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับคะแนน คือ 1 3 5 7 และ 9 โดยแต่ละช่วงคะแนนจะกำหนดให้มีพื้นที่ติดสีน้ำเงิน 1- 20, 21-40, 41-60, 61-80 และ 81-100 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ) นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ด้วย Least significant difference (LSD)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสอ้อย

จากผลการศึกษาพบว่าแคลลัสอ้อยทุกชิ้นสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ แคลลัสอ้อยมีการขยายขนาดและปริมาณเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 1) เมื่อย้ายแคคลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้น พบว่า แคลลัสอ้อยสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ตามปกติ (ภาพที่ 2) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kaur *et al.* (2008) ที่พบว่า การเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 250-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถส่งเสริมการแตกหน่อ เพิ่มความยาวของยอดและน้ำหนักสดของอ้อยได้ และงานวิจัยของ Mittal *et al.* (2009) ที่พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยส่งเสริมการเกิด somatic embryogenesis และการเกิดยอดในอ้อย

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

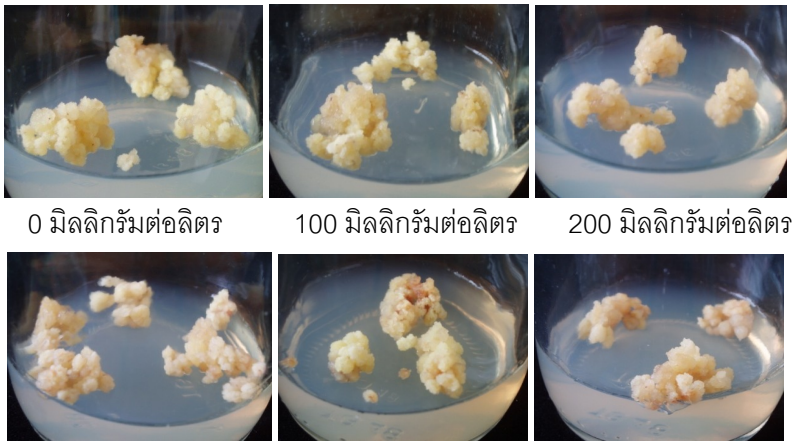
จากการเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 105 บนอาหารสูตร LB ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime พบว่าเชื้อเริ่มเจริญภายใน 1 วันและเจริญปกคลุมผิวหน้าอาหารภายในเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสามารถเจริญเติบโตได้ภายหลังการเลี้ยงนาน 4 วัน และเมื่อเลี้ยงต่อจนครบ 1 สัปดาห์ พบเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเจริญปกคลุมทั่วผิวหน้าของอาหาร ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 300 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ได้ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปทำนองเดียวกับการทดลองของ Xing *et al.* (2008) ดังนั้นการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมออกจากแคลลัสอ้อยภายหลังการถ่ายยีนจึงควรใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำให้แคลลัสอ้อยสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นได้ตามปกติในขณะที่เชื้ออะโกรแบคทีเรียมถูกกำจัดหมดไป

ผลของความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนแคลลัสอ้อย

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay โดยพิจารณาจำนวนชิ้นแคลลัสที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า ในแต่ละทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยการใช้เชื้อไม่ต้องเจือจาง ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 88.33% รองลงมา คือ การไม่เจือจางเชื้อร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 40 นาที และการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 30 นาที ซึ่งให้เปอร์เซนต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน 81.67%

และ 80% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เป็นไปในทำนองเดียวกับซึ่งการทดลองของ Cheng *et al.* (1997) พบว่า การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมความเข้มข้นสูง ส่งผลให้การแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวสูงตามไปด้วย

เมื่อพิจารณาระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า ในแต่ละวิธีการที่ทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่1) โดยการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:1 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 1.55 รองลงมา คือ การไม่เจือจางเชื้อ ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที และ การเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:10 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 30 นาที ให้ระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนแคลลัส 1.43 และ 1.08 ตามลำดับ ซึ่งแม้ว่าการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:1 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที จะมีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุดแต่เมื่อพิจารณาร่วมกับเปอร์เซนต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินกลับพบว่ามีค่า 75% ซึ่งน้อยกว่าวิธีการไม่เจือจางเชื้อร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ที่มีจำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินสูงถึง 88.33% ซึ่งผลจากการทดลองนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Arencibia *et al.* (1998) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pMTCA31G มีความหนาแน่น 1.0 x 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับระยะเวลาการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับแคลลัสอ้อยพันธุ์ Ja 60-5 และการทดลองของ Enríquez-Obregón *et al.* (1998) ที่ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ C58C1Rif^R ที่มีพลาสมิด pGV2260 มีค่า OD_{620} ประมาณ 0.6 และปลูกเชื้อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับอ้อยพันธุ์ Ja 60-5 และใกล้เคียงกับงานวิจัยของLiu *et al.* (2003) ที่ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 และ AGL1 ที่มีพลาสมิด pCL2, pCL3 และ pCL4 มีค่า OD_{600} = 0.5 ร่วมกับการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับแคลลัสอ้อยพันธุ์ CP-384 และให้ผลใกล้เคียงกับงานวิจัยในพืชชนิดอื่น เช่น Wang *et al.* (2003) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1300 ที่มีค่า OD_{600} = 0.5 ร่วมกับการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับใบยาสูบ และงานวิจัยของวิจิตราและคณะ (2549) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ ABI ที่มีพลาสมิด pMON51744 มีค่า OD_{600} = 1 ร่วมกับการ sonication นาน 80 วินาที หรือการ vortex นาน 5 และ 10 นาที ในการถ่ายยีนให้กับโซมาติคเอมบริโอมะละกอ

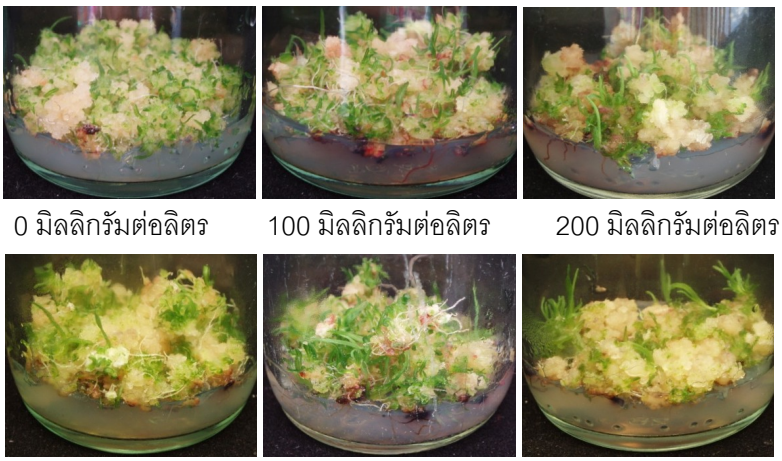


0 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

300 มิลลิกรัมต่อลิตร 400 มิลลิกรัมต่อลิตร 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ: Cefotaxime

ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของแคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10% โดยปริมาตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์



0 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

300 มิลลิกรัมต่อลิตร 400 มิลลิกรัมต่อลิตร 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ: Cefotaxime

ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของแคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 10% เพื่อชักนำต้น นาน 9 สัปดาห์ ภายหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10% ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี GUS histochemical assay บนแคลลัสอ้อย พันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA 105 ซึ่งภายในบรรจุพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304

ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ	ระยะเวลาปลูกเชื้อ (นาที)	เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน	ระดับคะแนนพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงิน
1:0	10	88.33 a [1/]	1.43 a [2/]
	20	70.00 a-e	0.85 a-f
	30	66.67 a-e	0.96 a-e
	40	81.67 ab	1.03 a-d
1:1	10	75.00 a-d	1.55 ab
	20	66.67 a-e	0.78 a-f
	30	66.67 a-e	0.91 a-e
	40	31.67 ef	0.38 efg
1:10	10	55.00 a-f	0.75 b-g
	20	55.00 a-f	0.56 c-g
	30	80.00 abc	1.08 abc
	40	43.33 b-f	0.48 c-g
1:20	10	41.67 b-f	0.56 c-g
	20	46.67 a-f	0.91 a-g
	30	51.67 a-f	0.51 c-g
	40	35.00 def	0.40 efg
1:50	10	38.33 c-f	0.533 c-g
	20	38.33 c-f	0.46 d-g
	30	55.00 a-f	0.71 c-g
	40	36.67 def	0.46 efg
1:100	10	55.00 a-f	1.00 a-e
	20	28.33 ef	0.28 fg
	30	40.00 b-f	0.40 efg
	40	21.67 f	0.217 g

[1/] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ LSD ที่ ระดับความเชื่อมั่น 99%

[2/] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตามการวิเคราะห์แบบ LSD ที่ ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปและเสนอแนะ

การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลด้านลบต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นของอ้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยได้ โดยสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับปัจจัยที่เหมาะสมกับการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม พบว่า การใช้เชื้อที่มีค่า OD_{600}~ 0.8-1 ร่วมกับระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยให้เปอร์เซนต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินเมื่อตรวจสอบแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* สูงที่สุดถึง 88.33% และมีระดับคะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงิน 1.43 จากค่าคะแนนเต็ม 9

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สกอ. ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การทดลอง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2553. **การส่งออกน้ำตาลไปนอกราชอาณาจักรจำแนกตามประเทศปลายทางยอดสะสม เดือนมกราคม-พฤษภาคม 2553**. แหล่งที่มา: http://www.ocsb.go.th/th/cms/detail.php?ID=183&SystemModuleKey=cuntry, 7 กันยายน 2553.

ปัทมา ศรีน้ำเงิน. 2546. **การถ่ายยีนบางส่วนของ antisense invertase เข้าสู่อ้อย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

พรชัย เหลืองอาภาพงษ์. 2551. **สารกำจัดศัตรูพืช:จำเป็นหรือฟุ่มเฟือย**. แหล่งที่มา: http://www.naewna.com/news.asp?ID=54612, 14 กรกฎาคม 2551.

วิจิตรา โหราเรือง, กนกวรรณ รมยานนท์, มัณฑนา บุญธรรม, Stanislaw Flasinski และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2549. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมของเนื้อเยื่อโซมาติคเอมบริโอมะละกอ. **ว.วิทย์.กษ.** 37(3):231-239.

Arencibia, A.D., E.R. Carmona, P. Tellez, M.T. Chan, S.M. Yu, L.E. Trujillo and P. Ormas. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Res.** 7: 213-222.

Cheng, M., B.A. Lowe, T.M. Spencer, X. Ye and C.L. Armstrong. 2004. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.** 40: 31-45.

Cheng, M., J.E. Fry, S. Pang, I. Zhou, C. Hironaka, D.R.I. Duncan, T.W.L. Conner and Y. Wang. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant. Physiol**. 115: 971-980.

Enríquez-Obregón, G.A., R.I. Vázquez-Padrón, D.L. Prieto-Samsonov, G.A. De la Riva and G. Selman-Housein. 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**. 206: 20-27.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene system. **Plant Mol. Biol. Rep**. 5: 387-405.

Jing-Sheng, X., G. Shiwu, X. Liping and C. Rukai. 2008. Construction of expression vector of *CryIA(c)* gene and its transformation in sugarcane. **Sugar Tech**. 10: 269-273.

Kaur, A., M.S. Gill, D. Ruma and S.S. Gosal. 2008. Enhanced *in vitro* shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime. **Sugar Tech**. 10: 60-64.

Liu, D., S.V.Oard and J.H. Oard. 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. **Plant Science**. 165: 743-750.

Manickavasagam, M., A. Ganapathi, V.R. Anbazhagan, B. Sudhakar, N. Selvaraj, A. Vasudevan and S. Kasthurirengan. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Rep**. 23: 134-143.

Mittal, P., S.S. Gosal, A. Senger and P. Kumar. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. **Physiol. Mol. Biol. Plants**. 15: 257-265.

Opabode, J.T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev**. 1: 12-20.

Wang, H-Y., Y-F Li, L-X Xie and P. Xu. 2003. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA-M1*, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. **J. Plant Res**. 116: 455-460.

Xing, Y.J., Q. Ji, Q. Yang, Y.M. Luo, Q. Li and X. Wang. 2008. Studies on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato. **African J. Biotech**. 7: 534-540.

Xu, L.-P., Y.-X. Que, J.-S. Xu, S.-R. Fang, M.-Q. Zhang, Y.-Q. Chen and R.-K. Chen. 2008. Establishment of genetic transformation system and obtaining transgenic sugarcane (var. badila) transformed with RS gene. **Sugar Tech**. 10: 128-132.