



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ **stilbenoid**
ในแคลลัสหนอนตายหายาก (*Stemona collinsae*) โดยการเพิ่มการแสดงออก
ของยีน **stilbene synthase (STS)**

โดยนางสาวสุภาพร ภัสสร

ธันวาคม 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ **stilbenoid**
ในแคลลัสหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae*) โดยการเพิ่มการแสดงออกของ
ยีน **stilbene synthase (STS)**

นางสาวสุภาพร ภัสสร มหาวิทยาลัยพะเยา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยพะเยา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
บทคัดย่อ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	5
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีดำเนินการวิจัย	9
ผลการทดลอง	19
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	46
เอกสารอ้างอิงโครงการวิจัย	48
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	50

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480007

ชื่อโครงการ: การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ stilbenoid ในแคลลัสหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae*) โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน stilbene synthase (STS)

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: นางสาวสุภาพร ภัสสร มหาวิทยาลัยพะเยา

อีเมล: ppapon@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: มิถุนายน 2554 - ธันวาคม 2559

บทคัดย่อ:

หนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่พบสารออกฤทธิ์กลุ่ม stilbenoid ที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอยู่ภายในราก โดยกระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ สติลบีซิน ซีนเทสที่จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โพลีคีไทด์ ซีนเทส แบบที่ 3 การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยากและศึกษาการแสดงออกของยีนสติลบีซิน ซีนเทส ที่ถูกส่งถ่ายเข้าสู่หนอนตายหยาก ในการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการส่งพลาสมิด pCAMBIA1304 โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มียีน *hpt* และยีน *gfp* เป็นยีนคัดเลือก จากการทดลองเบื้องต้น พบว่า สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ความเข้มข้น 40 มก./ล. เหมาะสมที่นำมาใช้ในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนได้สูงสุด 55 เปอร์เซ็นต์ คือ การใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (OD600 = 1) ที่เจือจางอัตรา 1:1 (สารแขวนลอยแบคทีเรีย: อาหารเหลวสูตร MS) และกระตุ้นเชื้อ *A. tumefaciens* โดยใช้สาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับการปลูกเขื่อนาน 30 นาที เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน

การศึกษาการส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยากโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ แคลลัสในการส่งถ่ายยีนทั้งหมด 60 แคลลัส พบว่า แคลลัสที่สามารถเจริญ และรอดชีวิตได้นับอาหารสูตรคัดเลือก จำนวน 31 แคลลัส จากนั้นตรวจสอบการมีอยู่ของยีน พบว่า มียีน *hpt* จำนวน 28 โคลน นำมาตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า มียีน STS จำนวน 18 โคลน และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay พบลักษณะการติดสีน้ำเงิน เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อแคลลัส จำนวน 18 โคลน ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน STS คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ และการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด (total phenolic compounds) จากต้นของหนอนตายหยากที่เติบโตมาจากแคลลัส ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง พบว่า การส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยาก ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในต้นหนอนตายหยากสูงขึ้น ในปริมาณที่แตกต่างกันไป ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง โดยต้นหนอนตายหยากที่เติบโต

มาจากแคลัสโคลนที่ 17 (STS/17) มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด คือ 83.70 มิลลิกรัมกรด- แกลลิก ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และมีปริมาณสาร pinosylvlin สูง คือ 6.66 นาโนกรัม/กรัมน้ำหนัก

คำหลัก : ต้นหนอนตายหายาก ยีนสติลปิน ชิ่นเทส การส่งถ่ายยีน

Abstract

Project Code: MRG5480007

Project Title: The development of Stilbenoid production in *Stemona collinsae* by Overexpression of stilbene synthase (*STS*) gene

Investigator: Miss Supaporn Passorn, University of Phayao

E-mail Address: ppapon@hotmail.com

Project Period: June 2012 - December 2016

Abstract:

Stemona collinsae Craib is one of medicinal plants. The root of them is known as the source of stilbenoid contained pharmacological properties. Stilbene synthase is a member of type III plant polyketide synthase (PKS) and plays a key role in the stilbenoid biosynthesis. This study investigated the efficiency of gene transformation and expression of Stilbene synthase gene (*STS*) into calli of *Stemona collinsae* Craib by *Agrobacterium*. A preliminary experiment to investigate a suitable concentration of hygromycin for the screening of transgenic plants was 40 mg/l. The transformation method demonstrated that callus of *S. collinsae* Craib inoculated for 30 min with *A. tumefaciens* suspension diluted from OD unit (at 600 nm) of 1.0 to 1:1 ratio (v/v) and added 100 μ M acetosyringone to promote the efficiency of gene transfer. This method obtained 55 percent transformation efficiency. Further study was the transformation of *STS* gene into 60 calli *S. collinsae* Craib using *A. tumefaciens* strain EHA105 containing plasmid pCAMBIA/STS. The *STS* gene and *hpt* gene were performed as a selectable marker to select transgenic plants. The results showed that 31 calli of *S. collinsae* Craib survived on medium supplemented with hygromycin for four weeks. Afterward checking of the *hpt* gene using PCR technique showed 28 positive clones and RT-PCR technique checking for *STS* gene expression showed only 18 positive clones. The GUS histochemical assay performed on each transformed explants pieces obtained 18 positive clones. The average of *STS* gene transfer efficiency was about 30 percent. Determination of total phenolic compounds in 18 plantlets regenerated from transformed calli showed that the amount of total phenolic compounds variously increased in each 18 plantlets. The *STS*/17 clone contained the highest amount of

total phenolic compounds and pinosylvin about 83.70 mg of gallic acid/100 grams of fresh weight and 6.66 ng/g of fresh weight.

Keywords : *Stemona collinsae* Craib, Stilbene synthase gene (*STS*), gene transformation

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากรากหนอนตายหยากมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรกรรมอย่างแพร่หลาย แม้จะมีการส่งเสริมการปลูกขยายพันธุ์หนอนตายหยากอย่างกว้างขวางโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเพิ่มปริมาณของหนอนตายหยาก ทดแทนการนำหนอนตายหยากจากป่ามาใช้ประโยชน์และป้องกันการสูญพันธุ์ของหนอนตายหยากในธรรมชาติได้แล้วนั้น แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการปลูกและระยะเวลาการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้รากหนอนตายหยากที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์สูง ต้องอาศัยระยะเวลานานและมีความไม่แน่นอนของปริมาณผลผลิตขึ้นซึ่งอยู่กับปัจจัยทาง สภาพแวดล้อม และภูมิอากาศ ดังนั้นการศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของหนอนตายหยากที่ใช้ในการเกษตรกรรม หรือทางด้านการแพทย์โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการนำองค์ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อพัฒนาศักยภาพการใช้ประโยชน์พืชสมุนไพรไทย

การวิจัยนี้จึงมุ่งเพื่อเพิ่มการผลิตสารออกฤทธิ์ในแคลลัสของหนอนตายหยาก โดยใช้เทคนิคทางด้านวิศวกรรมเมแทบอลิก (metabolic engineering) ในวิถีชีวสังเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในหนอนตายหยาก เนื่องจากมีรายงานการวิจัยพบว่าหนอนตายหยากหลายชนิดสามารถผลิตสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม phytoalexin เช่น สารอนุพันธ์ของ stilbenoid ชนิดต่าง ๆ โดยส่วนใหญ่สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา เช่น *Pyricularia grisea* ราโรคไหม้ (rice blast disease) *Cladosporium herbarum* ราก่อโรคภูมิแพ้ในคน รวมไปถึงมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และไวรัส กระบวนการสร้างสารกลุ่ม stilbenoid พบว่า stilbene synthase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า pinosylvin synthase เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้ การวิจัยในครั้งนี้จะทำการส่งถ่ายยีน stilbene synthase เข้าสู่แคลลัสเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน นำไปสู่การเพิ่มการผลิตสารออกฤทธิ์กลุ่ม stilbenoid ในหนอนตายหยาก ผลของการศึกษานี้จะสามารถนำเสนอแนวทางการปรับปรุงการผลิตสารออกฤทธิ์ในหนอนตายหยากเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และเป็นข้อมูลพื้นฐานระดับอนุพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสารออกฤทธิ์กลุ่ม stilbenoid ในหนอนตายหยาก อีกทั้งจะทำให้ได้เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหยากโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการดัดแปลงพันธุกรรมของหนอนตายหยากเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในกลุ่มอื่นๆ ต่อไป

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

หนอนตายหยาก เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Stemonaceae พบได้ในป่าทั่ว ๆ ไปของประเทศจีน ญี่ปุ่น อินโดจีน มาเลเซีย ลาว และสำหรับประเทศไทยพบหนอนตายหยากได้ทั่วทุกภาค ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่น และมีความหลากหลายในชนิด (species) ของหนอนตายหยาก เช่น

ปมดงาม (*Stemona berkili* Prain) พบที่ดอยสุเทพ เชียงใหม่

กระเพียด หรือ หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour) พบที่ ประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี เพชรบุรี นครสวรรค์ แม่ฮ่องสอน

ปรางค์ หรือ หนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib) พบทางภาคเหนือและภาคกลาง พืชสกุลนี้มีลักษณะเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าหรือหัวอยู่ใต้ดิน ลำต้นเหนือดินตั้งตรงหรือเลื้อย ใบเดี่ยวรูปหัวใจ ปลายแหลมหรือรูปใบคล้ายใบพลูแต่ปลายใบจะแหลมยาว เส้นใบตามยาวมีหลายเส้นเห็นชัดเจนในแนวขนานกับขอบใบ ดอกเป็นกลีบคล้ายดอกจำปามีกลีบดอกสีขาวข้างในสีม่วงแดง ฝักเล็กปลายแหลมสีน้ำตาล ออกดอกในช่วงฤดูฝนมีสีขาวหรือสีม่วงแล้วแต่พันธุ์ ลำต้นใต้ดินจะมีรากออกเป็นพวงรูปกระสวย มีจำนวน 50-80 ราก แต่ละรากยาว 12-20 ซม. (กฤษณา ภูตคาม, 2525 และ เต็ม สมิตินันท์, 2523)

หนอนตายหยากจัดเป็นพืชสมุนไพรที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์มาเป็นเวลานาน โดยนำรากมาใช้เป็นยาทางต้านแพทย์แผนโบราณ (สมจิตร พงษ์พงษ์ และสุภาพ ภูประเสริฐ, 2515) นำมาต้มเป็นน้ำสมุนไพรเพื่อบำรุงกำลังหรือใช้รากแช่เหล้าเป็นยาแก้ไอ ขับเสมหะ ซึ่งในประเทศไทยใช้เป็นรักษาโรคผิวหนัง ยาขับพยาธิ น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรคพยาธิภายใน มะเร็งตับ ลดระดับน้ำตาลสำหรับโรคเบาหวาน (Salalamp, 1996 and Akanitapichat, et. al., 2005) นอกจากนี้ยังนำไปใช้ด้านการเกษตรกรรม เช่น ใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น หนอนกักกินใบ เพลี้ยอ่อน และลูกน้ำยุง (นันทวัน บุญยประภัสร์ และ อรุณ โชคชัยเจริญพร, 2543) ในด้านปศุสัตว์พบว่าเกษตรกรใช้รากหนอนตายหยากตำละเอียดให้น้ำหยอดใส่แผลโคและกระบือที่มีหนอนแมลงวันไชยอยู่จะสามารถฆ่าหนอนได้ดี (สมจิตร พงษ์พงษ์ และสุภาพ ภูประเสริฐ, 2534) มีรายงานการใช้รากหนอนตายหยากผสมในอาหารไก่ ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งพัฒนาการของหนอนแมลงวันที่เจริญเติบโตในมูลไก่ได้ โดยผลการผสมรากหนอนตายหยากสดให้ผลดีกว่าหนอนตาย หยากแห้ง (วัชรชัย ศุภดิษฐ์ และคณะ, 2545)

การศึกษาสารออกฤทธิ์กลุ่ม stilbenoid ในหนอนตายหยาก

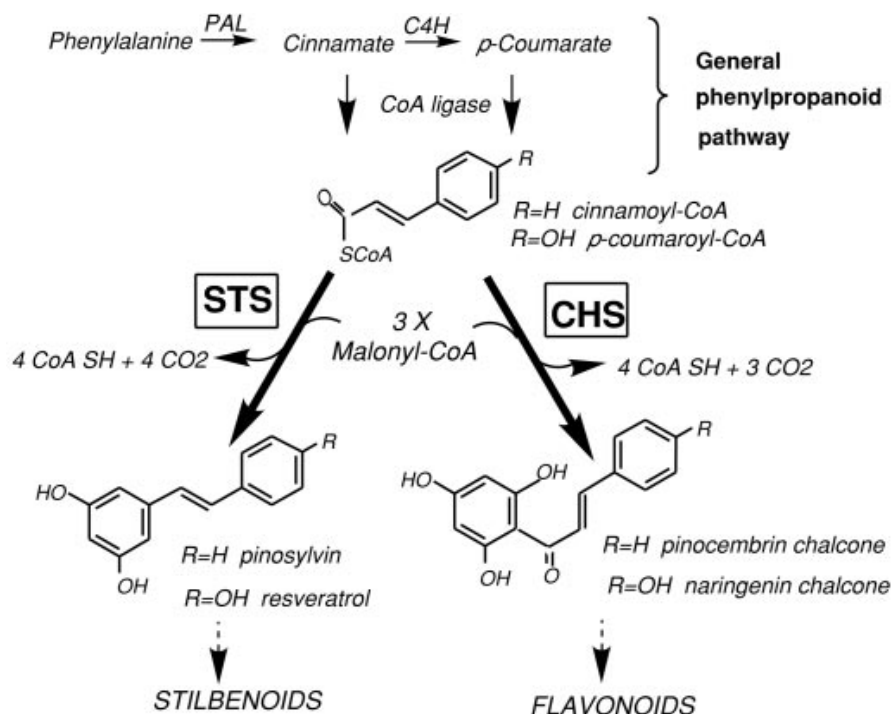
การศึกษาสารสกัดในหนอนตายหยากหลายชนิดโดยใช้ตัวทำละลายเมธานอล พบว่ามีสารออกฤทธิ์สำคัญสองกลุ่มหลักในหนอนตายหยาก คือ สารออกฤทธิ์ในกลุ่มอัลคาลอยด์ เช่น สารพวก stemonone, stemofoline, dehydrotstemofoline และ stemocochinin มีคุณสมบัติในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (Jiwajinda, et. al. 2001) และสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม stilbenoid มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา เช่น *Cladosporium herbarum*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Colletotrichum gloeosporioides* เมื่อนำสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม stilbenoid มาวิเคราะห์โดยแยกสารประกอบและจำแนกให้บริสุทธิ์แล้ว พบสารอนุพันธ์นี้กว่า 20 ชนิด ในหนอนตายหยาก (Pacher, et. al., 2002 and Kosteki, et. al, 2004) ดังที่ Pacher และคณะ รายงานการสกัดสารจาก *Stemona collinsae* พบสารออกฤทธิ์ stilbenoid ชนิดใหม่ถึง 11 ชนิด ในกลุ่มอนุพันธ์ phenylbenzofuran และ 4 ชนิดในกลุ่ม dihydrostilbene รวมทั้งสารอนุพันธ์ที่รู้จักอีก 4 ชนิด คือ pinosylvin, 4' methylpinosylvin, dihydrostilbene และ stilbostemin B และ D เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า stilbostemin B, stemofuran B และ E เป็นสารอนุพันธ์หลักที่พบในหนอนตายหยาก ชนิด *Stemona collinsae* มีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช *Alternaria citri*, *Fusarium*

avenaceum, *Pyricularia grisea* และ *Botrytis cinerea* (Pacher, et. al., 2002) มีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับสารอนุพันธ์ stilbenoid ที่ได้จากสารสกัดหนอนตายหยากรายงานว่า stemanthrene B และ C มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และอาการโรคหอบหืด (antiasthmatic) เนื่องจากสามารถยับยั้งการสร้าง Leukotriene เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เกิดการอักเสบปวดบวมของโรคต่างๆ (Adams, et. al. 2005) นอกจากนี้ Lin และคณะ พบว่าสารออกฤทธิ์ stilbenoid ที่สกัดจากหนอนตายหยากชนิด *Stemona tuberosa* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial) โดยเฉพาะ มีฤทธิ์ต้านทานสูงต่อเชื้อ *Bacillus pumilus* (Lin, et. al., 2008)

กระบวนการสร้างสารออกฤทธิ์ Stilbenoid

Stibenoid เป็นสารทุติยภูมิที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีโครงสร้างคล้ายกับสาร estrogen พบได้ในพืชหลายชนิด จะถูกสร้างเมื่อพืชได้รับอันตราย (photoalexin) เช่น เกิดบาดแผล เกิดโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ หรือถูกกระตุ้นด้วยแสง UV เป็นต้น การสังเคราะห์ Stilbenoid ต้องอาศัย phenylpropanoid pathway ในการสร้าง cinnamoyl-CoA เพื่อใช้เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ stilbene synthase (STS) ในการผลิตสาร Stilbenoid (Roupe, et. al., 2006)

เอนไซม์ stilbene synthase (STS) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม polyketide synthase (PKS) ทำหน้าที่ให้การสังเคราะห์สาร stilbenoid หลักคือ pinosylvin หรือ resveratrol ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ stilbenoid ชนิดอื่นต่อไป กระบวนการสังเคราะห์ประกอบด้วย malonyl-CoA 3 โมเลกุล และ cinnamoyl-CoA 1 โมเลกุล จะได้ผลผลิตที่เกิดขึ้น คือ pinosylvin พบได้ในกลุ่มพืชจำพวกต้นสน *Pinus densifora* และ *Pinus thunbergii* ในกรณีถ้าใช้ *p-coumaroyl-CoA* เป็นซับสเตรตผลผลิตที่เกิดขึ้นจะเป็น resveratrol พบได้ในพืชถั่ว (*Arachis hypogaea*) และ องุ่น (*Vitis vinifera*) ด้วยเหตุนี้ stilbene synthase จึงถูกแบ่งย่อยได้เป็น pinosylvin synthase และ resveratrol synthase ความจำเพาะต่อซับสเตรตและผลผลิตที่เกิดขึ้น ดังในรูปแสดงถึงกระบวนการสังเคราะห์สาร stilbenoid และ flavonoid โดยผ่านกระบวนการที่คล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันที่การสังเคราะห์ flavonoid เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (Kodan, et. al., 2002)



ภาพ 1 รูปภาพแสดงกระบวนการสังเคราะห์สาร stilbenoid และ flavonoid (Kodan, et. al., 2002)

การแสดงออกของยีน **stilbene synthase** ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

ปัจจุบันมีรายงานการส่งถ่ายยีน *stilbene synthase* เข้าสู่พืชหลากหลายชนิด เช่น ใบบาส (tobacco), ข้าว (rice), น้ำมันเมล็ดเรพ (oilseed rape), บาร์เลย์ (barley) (Leckband, and Lorz, 1998.) และแอปเปิ้ล (Szankowski, et. al., 2003) พบว่าพืชที่ได้รับยีนชนิดนี้จะมีสามารถในการต้านทานโรคเพิ่มขึ้น อีกทั้ง Hain และคณะ ได้รายงานการศึกษาในถั่ว และ องุ่น ผลจากการส่งถ่ายยีน *stilbene synthase* ทั้งสองชนิด *Vst 1* และ *Vst 2* ทำให้สามารถผลิตสาร phytoalexin ชนิดใหม่ สูงขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วย elicitor หรือ เชื้อก่อโรค (pathogen induction) (18) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการศึกษาและใช้ประโยชน์จากยีนในกลุ่ม *stilbene synthase* ยังคงเป็นที่สนใจอย่างกว้างขวางในพืชเศรษฐกิจหลากหลายชนิด เนื่องจากมีประโยชน์ทั้งในแง่การเพิ่มผลผลิตสารที่มีคุณค่าในการแพทย์และการเกษตรกรรม เช่น pinosylvin และ resveratrol อีกทั้งในแง่การปรับปรุงสายพันธุ์พืชเพื่อให้มีความต้านทานต่อโรคต่างๆ เพิ่มขึ้น การวิจัยในครั้งนี้จะทำการส่งถ่ายยีน *stilbene synthase* เข้าสู่แคลลัสเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน นำไปสู่การเพิ่มการผลิตสารออกฤทธิ์กลุ่ม stilbenoid ในหนอนตายหยาก โดยมุ่งหวังที่จะนำผลการวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์เพื่อศึกษาและเข้าใจถึงขั้นตอนการสังเคราะห์สารกลุ่ม stilbenoid ให้มีปริมาณมากขึ้นในหนอนตายหยาก ซึ่งจะนำไปสู่การใช้ประโยชน์และเพิ่มคุณค่าอย่างสูงสุดในสมุนไพรหนอนตายหยาก

วัตถุประสงค์โครงการ

1. ศึกษาความเป็นไปได้และประสิทธิภาพของถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหยาก โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย
2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณการสร้างสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม stilbenoid โดยส่งถ่ายยีน *Stilbene synthase like gene (STS)* เข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหยาก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นหนอนตายหยาก เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีระดับความเข้มข้น ของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่าง ๆ

นำต้นหนอนตายหยาก ที่เลี้ยงในอาหารวันสูตร MS ที่เติม BA 10 มก./ล. อายุการเพาะเลี้ยง 6 เดือน มาตัดใบ และราก ออก ให้ได้ชิ้นส่วนของข้อที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ย้ายชิ้นส่วนของข้อ มาเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบการเจริญบนอาหารวัน สูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แปรผันระดับความเข้มข้นต่างกัน ดังแสดงในตาราง 1 โดยส่วนข้อที่ใส่ในอาหารเหลว ½ MS นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 120 รอบ/นาที่ ภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 37.6 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในส่วนการเลี้ยงบนอาหารวันสูตร MS นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และขยายระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง รวมเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized block design: CRD) ทำการทดลอง 15 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีเนื้อเยื่อ 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด รวมทั้งหมด 32 ทริตเมนต์ บันทึกภาพ และข้อมูลจำนวนการเกิดแคลลัส จำนวนยอด และความยาวยอด ที่เกิดขึ้น

ตาราง 1 แสดงความเข้มข้นของ 2, 4-D และ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

อาหารวันสูตร MS/ อาหารเหลว ½ MS	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	
	2, 4-D (มก./มล.)	BA (มก./มล.)
1	ไม่เติม	ไม่เติม
2	ไม่เติม	1
3	ไม่เติม	3
4	ไม่เติม	5
5	0.1	ไม่เติม
6	0.1	1
7	0.1	3
8	0.1	5
9	0.5	ไม่เติม
10	0.5	1
11	0.5	3
12	0.5	5
13	1	ไม่เติม
14	1	1
15	1	3

อาหารวันสูตร MS/ อาหารเหลว ½ MS	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช	
	2, 4-D (มก./มล.)	BA (มก./มล.)
16	1	5

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ใช้ในการคัดเลือกแคลลัสหนอนตายหยาก ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

นำแคลลัสหนอนตายหยากมาบด ให้มีการกระจายตัวเป็นชิ้นเล็ก ที่มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารวันสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. และ 2, 4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่กรองด้วยแผ่นกรองแบคทีเรีย เติมน้ำในอาหารที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 มก./ล. ทำการทดลอง 6 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 5 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช จากนั้น เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิม ทุก 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการตายของเนื้อเยื่อแคลลัส ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized block design: CRD)

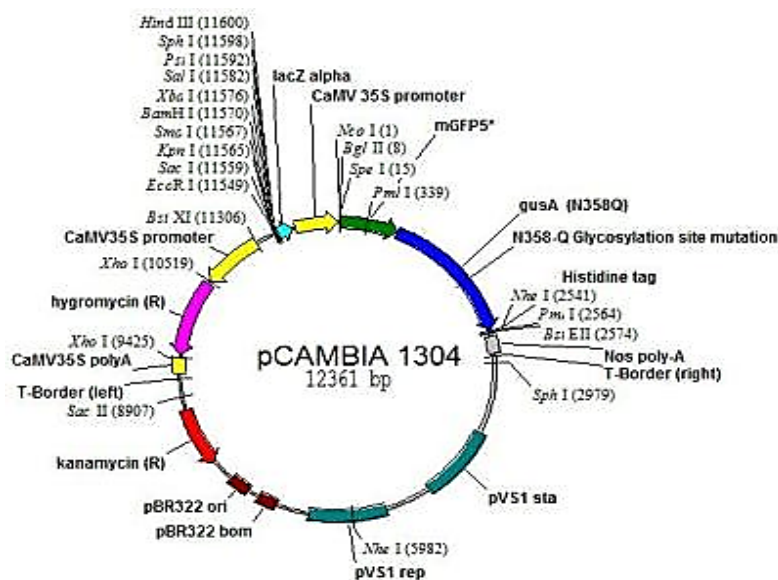
3. การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 หรือพลาสมิด pCAMBIA1304/ STS (เข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย)

3.1 เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช

แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

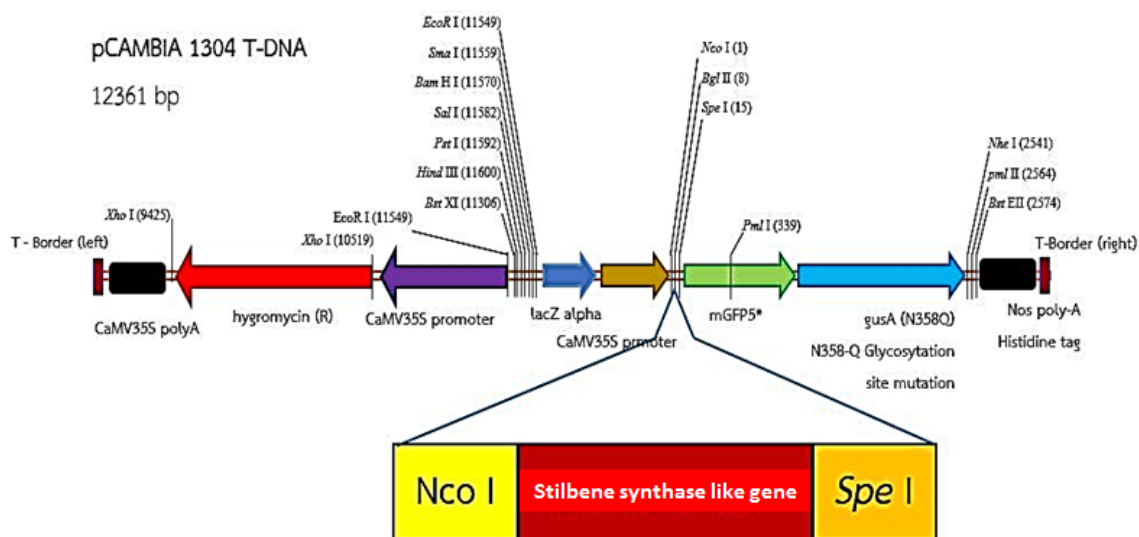
พลาสมิด pCAMBIA 1304 โดยมียีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือกในพืช และยีน *gfp* เป็นยีนรายงานอยู่ภายใต้การควบคุมการทำงานของ 35S promoter และ NOS polyA terminator ทำหน้าที่ควบคุมการหยุดการแสดงออกของยีน (ภาพที่ 2)

พลาสมิด pCAMBIA1304/ STS ที่เกิดจากการตัดต่อพลาสมิด pCAMBIA1304 ในตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SpeI* เชื่อมต่อกับยีน Stilbene synthase like gene (STS) โดยมีโปรโมเตอร์ CaMV 35S ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน และเทอร์มิเนเตอร์คือ *nos* ทำหน้าที่ควบคุมการหยุดการแสดงออกของยีน (ภาพที่ 3)



ภาพ 2 แสดงแผนที่พลาสมิด pCambia1304 ขนาด 12, 361 bp

ที่มา: Baesi, et al., 2011



ภาพ 3 แสดงส่วนของพลาสมิด pCambia1304/ STS ในบริเวณระหว่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SpeI จะมียีน *Stilbene synthase like gene* (STS) บรรจุอยู่

3.2 การเตรียม competent cell ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร สูตร LB broth ปริมาตร 5 มล. ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 2 วัน จากนั้น นำเชื้อ ปริมาตร 5 มล. ใส่ลงในอาหารสูตร LB broth ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มล. และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-5 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.5-1.0 ด้วยเครื่องวัดค่าการ

ดูดกลืนแสง นำเชื้อมาแช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้น เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มล. นำไปเขย่าในสภาพเย็นที่เครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกว่าเซลล์จะละลาย ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 25 มล. ปั่นกับตะกอนเซลล์ จากนั้น เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย กลีเซอรอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,800 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเก็บเซลล์ 200 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ และนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส หรือ-80 องศาเซลเซียส

3.3 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 หรือพลาสมิด pCAMBIA1304/ STS เข้าสู่โอรแบคทีเรีย โดยใช้วิธีการกระแสไฟฟ้า (electroporation)

นำพลาสมิด pCAMBIA1304/STS ใส่แยกลงใน competent cell ผสมให้เข้ากันในแต่ละหลอด จากนั้น แช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที ดูดสารละลายในแต่ละหลอด ใส่ลงใน cuvette (เย็น) แล้วเซตให้แห้ง นำไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง electroporator ซึ่งใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่ 12.5 kV/cm^2 ความต้านทาน 200Ω และค่าปริมาณกระแสไฟฟ้า $2.5 \mu\text{F}$ ดูดสารละลายในแต่ละหลอด ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ลงในหลอดอาหารสูตร LB broth ปริมาตร 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์โอรแบคทีเรีย มาเกลี่ยให้แห้งบนอาหารแข็งสูตร LB (spread plate) และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มก. /ล. จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้น นำโคโลนีของเชื้อโอรแบคทีเรีย ไปเลี้ยงในอาหารสูตร LB เหลว ปริมาตร 3 มล. ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียมการสกัด พลาสมิดเพื่อคัดเลือกเฉพาะโอรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดและนำไปใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหนอนตายหายากต่อไป โดยเชื้อ *A. tumefaciens* /pCAMBIA1304 จะหมายถึง เชื้อ *A. tumefaciens* ที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1304 และ *A. tumefaciens* / pCAMBIA1304/ STS จะหมายถึง *A. tumefaciens* ที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304/ STS

4. การศึกษาการส่งถ่ายยีน เข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหายาก โดยใช้เชื้อ

***A. tumefaciens* /pCAMBIA1304 เป็นพาหะ**

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อโอรแบคทีเรีย และปัจจัยที่เหมาะสม สำหรับการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหนอนตายหายาก โดยทำการทดสอบระดับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ ระยะเวลาที่ใช้ปลูกเชื้อบนแคลลัส แบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ 30 และ 60 นาที ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อโอรแบคทีเรีย แบ่งเป็น 2 ระดับ คือ ระดับการเจือจาง 1:1 และระดับการเจือจาง 1:10 และปัจจัยที่ 3 คือ ความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้นที่

แตกต่างกัน 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ทำการทดลอง 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 20 แคลลัส ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized block design: CRD) วิเคราะห์ผลจากการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส ดังนี้

(จำนวนการรอดชีวิตของแคลลัสในระยะเวลา 4 สัปดาห์ / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) x 100

4.1 การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1304 เพื่อใช้เป็นพาหะในการส่งยีนเข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยาก

จากการทดลองใช้ *A. tumefaciens* /pCAMBIA1304 ซึ่งมียีน *hpt* และยีน *gpf* ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อ พืชที่รอดชีวิตหลังจากการส่งถ่ายยีน ทำการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มก./ล. เลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ในปริมาตร 50 มก./ล. และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มก./ล. นำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เลี้ยงในสภาพมืด เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่า OD600 = 1 นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,800 รอบต่อนาที และนำตะกอนที่ได้ไปละลายในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจะได้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรีย นำไปใช้ในการส่งถ่ายยีน

4.2 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน

นำแคลลัสที่ได้จากการชักนำแคลลัสหนอนตายหยาก บนอาหารสูตรชักนำมาบดในโกร่งบด เพื่อให้แคลลัสแยกออกจากกันเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ซึ่งได้นำไปใช้ในขั้นตอนการส่งถ่ายยีน

4.3 การส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหยากเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* /pCAMBIA1304 ของแคลลัสที่เตรียมไว้จากการทดลอง (ข้อ 3) ใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นเชื้อที่ค่า OD600 = 1 โดยทำการเจือจาง 2 ระดับ คือ ระดับเจือจางอัตรา 1:1 (สารแขวนลอยแบคทีเรีย: อาหารเหลวสูตร MS) และระดับเจือจาง 1:10 ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 100 ไมโครโมลาร์ และ 200 ไมโครโมลาร์ จากนั้น นำไปบ่มเพาะเลี้ยงร่วมกับแคลลัสหนอนตายหยากบนเครื่องเขย่า เป็นระยะเวลา 30 นาที และระยะเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อบนอาหารวุ้น สูตร MS และเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เพาะเลี้ยงในสภาพมืด เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้น นำแคลลัสมาล้างในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 300 มก./ล. เพื่อกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* /pCAMBIA1304 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และล้างด้วยกระดาษที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้น ทำการย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. และเติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 300 มก./ล. ร่วมกับเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 40 มก./ล. โดยต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาทั้งหมด 4 สัปดาห์ นำแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรคัดเลือก ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งประกอบด้วย อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. จากนั้น นำต้นที่สมบูรณ์มาตรวจสอบ

การมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* และยีน *gfp* เพื่อนำผลการทดลองที่ดีที่สุดไปใช้ในการส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัสหนอนตายหายากได้ ต่อไป

5. การตรวจสอบต้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction)

เมื่อคัดเลือกแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก จากการส่งถ่ายยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และ ยีน *gfp* โดยวิธี ดังนี้

5.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากแคลลัส ด้วยวิธี DNAzol[®] Reagents (invitrogen)

คัดเลือกแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากการส่งถ่ายยีน ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งมา เชื้อมาแล้ว จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที นำมาบดให้ละเอียดในขณะบดจะใช้ร่วมกับ ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เพื่อให้รักษาความเป็นแก๊เซลล์ จากนั้นนำผงละเอียดของเซลล์ หนอนตายหายากที่ได้ประมาณ 500 - 1,000 มิลลิกรัม มาเติมสาร DNAzol[®] Reagents ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อสารเดียวกันด้วยเครื่อง vortex จากนั้น นำไปปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสให้หมดไมโครเซนติฟิวส์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติมนเอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-3 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เททิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เททิ้งส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนซ้ำอีก 1 ครั้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ตากให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* และยีน *gfp* โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ดังนี้

นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 5.1 มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* และยีน *gfp* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ ยีน *hpt* และยีน *gfp* ปฏิกริยาพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม จากตัวอย่าง ต้นหนอนตายหายากที่ผ่านการส่งถ่ายยีนที่ และใช้ดีเอ็นเอพลาสมิด pCambia1304 และ พลาสมิด pCambia1304/STS เป็นตัวอย่างควบคุม ส่วนผสมของปฏิกริยาพีซีอาร์ ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ชุดสารเคมี Dream Taq green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific Inc.) ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด อย่างละ 0.250 ไมโครโมลาร์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกริยา นำผลของพีซีอาร์ที่ได้ มาแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และย้อมเจลที่ได้

ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจดูขนาดของ ดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 800 คู่เบส

HPT-2 Forward: 5'-CCT GAA CTC ACC GCG ACG -3'

HPT-2 Reverse: 5'-AAG ACC ATG CGG AGC ATA TA-3'

ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gfp* เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 636 คู่เบส

gfp-f: 5'-TGC CTG AGG GAT ACG TGC-3'

gfp-r: 5'-ACT TCG CGC TGA TAC CAG A-3'

6. การศึกษาการส่งถ่ายยีน เข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหายาก โดยใช้เชื้อ

A. *tumefaciens* / pCAMBIA1304/ STS

การส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหายาก โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ซึ่งบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304/STS ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยขั้นตอนการส่งถ่ายยีน โดยใช้วิธีจากวิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหายากที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากการทดลองใน ข้อ 4 คือ การเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย *A. tumefaciens* / pCAMBIA1304/ STS เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นย้ายแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และนำไปเลี้ยงต่อในสภาพมืด เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำแคลลัสมาล้างในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีฟทาซิม ความเข้มข้น 300 มก./ล. เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* และล้างแคลลัส จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำมาชุบด้วยกระดาษที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. และ 2, 4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับเติมสารปฏิชีวนะซีฟทาซิม ความเข้มข้น 300 มก./ล. และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 40 มก./ล. และเปลี่ยนอาหารใหม่ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาทั้งหมด 4 สัปดาห์ นำแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ บนอาหารสูตรคัดเลือก ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งประกอบด้วย อาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. เพื่อนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน STS ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* ยีน *gfp* และตรวจสอบการย้อมติดสีน้ำเงินของ *gus* ต่อไป

6.1 ตรวจสอบผลการมีอยู่ของยีน STS ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

6.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) โดยใช้วิธี TRizol Reagent (Invitrogen)

นำแคลลัสที่รอดจากการส่งถ่ายยีน มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการหนึ่งฆ่าเชื้อมาแล้ว จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที บดแคลลัสให้ละเอียด โดยใช้ไนโตรเจนเหลว

(liquid nitrogen) ช่วยให้ตัวอย่างเย็นอยู่ตลอดเวลา เป็นการป้องกันการสลายตัวของอาร์เอ็นเอ จากนั้น เติมสารละลาย TRIzol Reagent ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุตัวอย่างที่ได้รับการบดให้ละเอียดแล้ว ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ประมาณ 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 นาที จากนั้น นำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนชั้นบน ซึ่งจะมีลักษณะใส ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการเติม Isopropanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดไปมา วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้น นำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วที่ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นผึ่งตะกอนอาร์เอ็นเอจนแห้ง โดยใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที แล้วจึงละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วยน้ำ (DEPC-treated water) ปริมาตร 20-25 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วัดปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) เครื่อง Spectrophotometer นำมาคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้

6.1.2 การกำจัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม

กำจัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ออกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ DNase I (Fermentas, USA) โดยทำปฏิกิริยาดังนี้ นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 3 ไมโครกรัม เติม 10X DNase I Reaction buffer ที่ผสม $MgCl_2$ ไว้แล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม DNase I จำนวน 1 ไมโครลิตร (2 unit/ul) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ด้วย DEPC จนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม 50 mM EDTA จำนวน 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I จากนั้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

6.1.3 สังเคราะห์ first-strand cDNA (1st cDNA) ด้วย RevertAidTMM-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) และการทำ RT-PCR โดยมีวิธีการ ดังต่อไปนี้

การสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอ (Total RNA) ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม เติมสาร dNTPs 10 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) และเติมไพรเมอร์ Oligo (dT) ความเข้มข้น 100 μ M ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาดด้วยความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณของปฏิกิริยา PCR ต่อไป โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน STS (RTFSTSc6 Forward และ gfp Reverse) ใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร

20 ไมโครลิตร โดยใช้ชุดสารเคมี Dream Taq green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific Inc.) และเติมคู่ไพรเมอร์ RTFSTSc6 และ gfp-r ความเข้มข้น 0.250 ไมโครโมลาร์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลของพีซีอาร์ที่ได้ มาแยกขนาดดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ และย้อมเจลที่ได้ด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ โดยยืน STS จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด

ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยืน STS เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 2,180 คู่เบส

RTFSTSc6 Forward: 5'-ATC ACC CAC CTC GTC TTC-3'

gfp Reverse: 5'-TGC CTG AGG GAT ACG TGC-3'

7. การตรวจสอบการแสดงออกของยืน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay

นำแคลลัสหนอนตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยืน และผ่านการคัดเลือกโดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกราไมซิน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มาตรวจสอบการแสดงออกของยืน *gus* (เอนไซม์ β -glucuronidase) ด้วยวิธี GUS histochemical assay ตรวจสอบการแสดงออกของยืน *gus* ภายในเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยืน โดยดูการติดสีน้ำเงินของชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยืน ซึ่งเกิดจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ β -glucuronidase โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำเนื้อเยื่อพืชที่ได้จากการส่งถ่ายยืน มาล้างในสารละลายซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับน้ำส่วนเกินที่ติดมากับชิ้นเนื้อเยื่อออก จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาแช่ในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) (0.05 mM X-Gluc in 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 0.1 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100, 0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ และ 0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และแช่ตัวอย่างในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 15-20 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้เห็นการติดสีน้ำเงินชัดเจนขึ้นด้วย หรือจนกระทั่งเห็นว่า คลอโรฟิลล์หมด แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยืน *gus* จากการติดสีน้ำเงิน ภายในชิ้นเนื้อเยื่อ ที่ได้รับการส่งถ่ายยืน

8. การสกัด และวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compound) ในแคลลัสหนอนตายหยาก ที่ได้รับการส่งถ่ายยืน *Stilbene synthase like gene (STS)*

นำต้นหนอนตายหยากที่รอดจากการส่งถ่ายยืน โดยตัดชิ้นส่วนของข้อ ย้ายเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS เป็นอาหารสูตรชักนำยอด และต้นสมบูรณ์ ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 120 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง $37.6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ สกัดสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compound) โดยนำต้นสมบูรณ์หนอนตายหยาก ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS นำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง ๆ ละ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น ร้อยละ 80 จำนวน 10 มล. บั่นให้

เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 2 นาที แล้วนำไปปั่นสะเทือน ด้วยคลื่นเสียง (Sonicate) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง โดยเครื่องเหวี่ยงแยก ด้วยความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกส่วนใสออกมาใส่ขวดใหม่ ปรับปริมาตรอีกครั้ง ให้มีปริมาตรสุดท้ายจำนวน 10 มล. เก็บตัวอย่างในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้น นำมาวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compound) โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ทำการดูดสารละลายตัวอย่างที่สกัดแล้ว 0.1 มล. เติมน้ำกลั่น จำนวน 0.5 มล. หลังจากนั้นเติมฟอลิน-ซีเคาตูรีเอเจนท์ 0.1 มล. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม 7.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 1 มล. เติมน้ำกลั่น จำนวน 1 มล. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 90 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยเทียบกับสารเทียบมาตรฐานกรดแกลลิก ในช่วงความเข้มข้น 20-100 ppm รายงานค่าในหน่วยมิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

9. การสกัด และวิเคราะห์ปริมาณสาร pinosylvin ในต้นหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *Stilbene synthase like gene (STS)* ดังนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณ pinosylvin ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวแทนของสาร กลุ่ม stilbenoid ในหนอนตายหยาก มีขั้นตอน ดังนี้ นำตัวอย่างต้นที่บดละเอียด จำนวน 1 กรัม จากนั้นเติมสารละลายเมทานอล ที่ประกอบด้วย สารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 มล. และ เติม 2 N HCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปต้มในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาปั่นแยกกาก และนำส่วนใสของสารสกัดมาทำให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจน ทำการละลายสารสกัดอีกครั้ง ด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 มล. เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร pinosylvin โดยเครื่อง HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน pinosylvin

10. สถิติที่ใช้ในการทดลอง

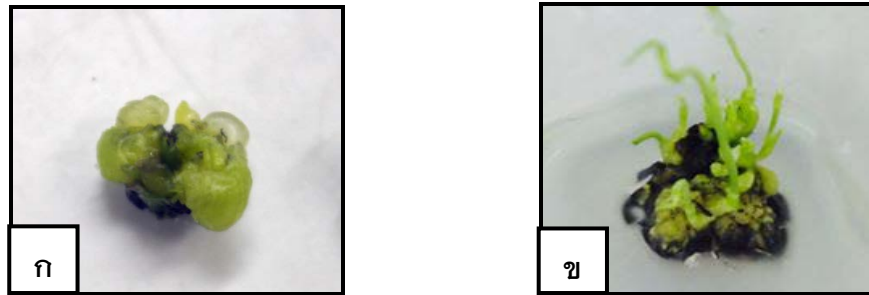
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าสถิติ และค่าเฉลี่ย ระดับการแสดงออกของยีน โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Statistical Package for the Social Science for windows (SPSS)

ผลการทดลอง

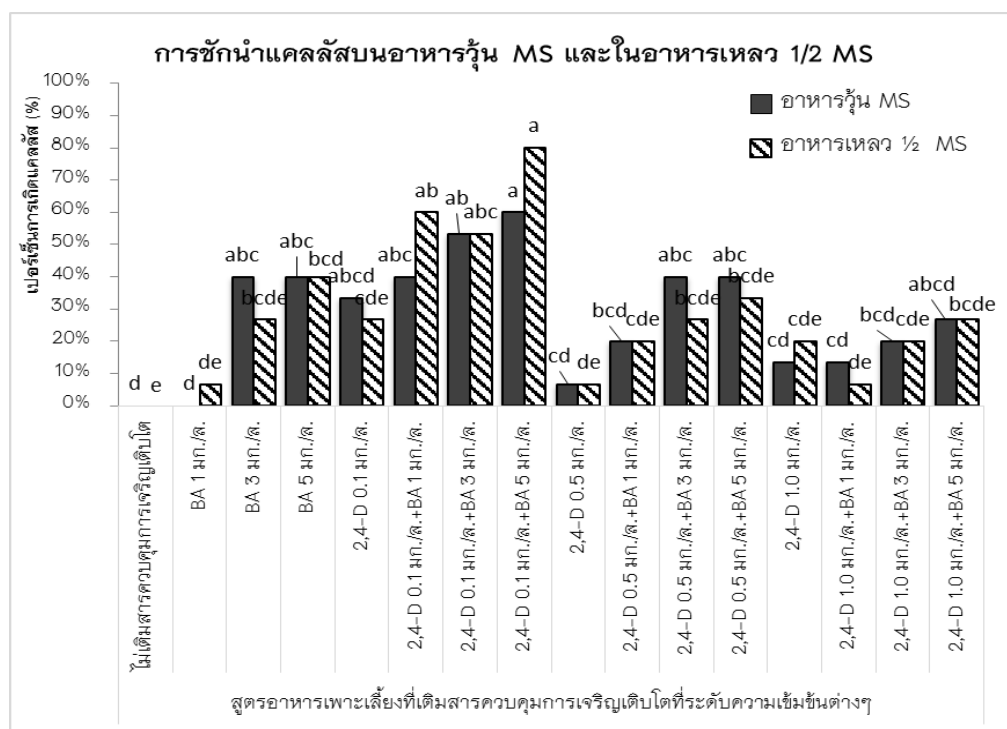
1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นหนอนตายหยาก เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีระดับความเข้มข้น ของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่าง ๆ

1.1 ผลของ BA และ 2, 4-D ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และชักนำการเกิดยอดจำนวนมาก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ในการศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อต้นหนอนตายหยาก โดยการเปรียบเทียบระหว่าง การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5 พบว่า ในสูตรอาหารเหลว ½ MS เพาะเลี้ยงที่เติม BA ร่วมกับ 2, 4-D มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS เป็นอาหารครึ่งสูตร ที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น เนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS มีการเจริญที่ดี และค่อนข้างเร็ว จากการทดลอง พบว่า ชิ้นส่วนของข้อที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ที่มี BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 4ก) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด และความเข้มข้นอื่น ๆ ส่วนการทดลองการชักนำชิ้นส่วนของข้อให้เกิดเป็นแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ที่มี BA 3 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 53 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 4ข) สำหรับในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สิ่งที่เราควรระวังในเรื่องการถ่ายเทอากาศของเนื้อเยื่อ ถ้าเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว จำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ควบคุมไปด้วยเสมอ เพราะการเขย่าจะช่วยให้ออกซิเจนละลายลงในอาหาร ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้ดี เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในอาหารแข็ง หรือกึ่งแข็ง มักเจริญเติบโตได้ช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (อรรถิ สหวัชรินทร์, 2526)



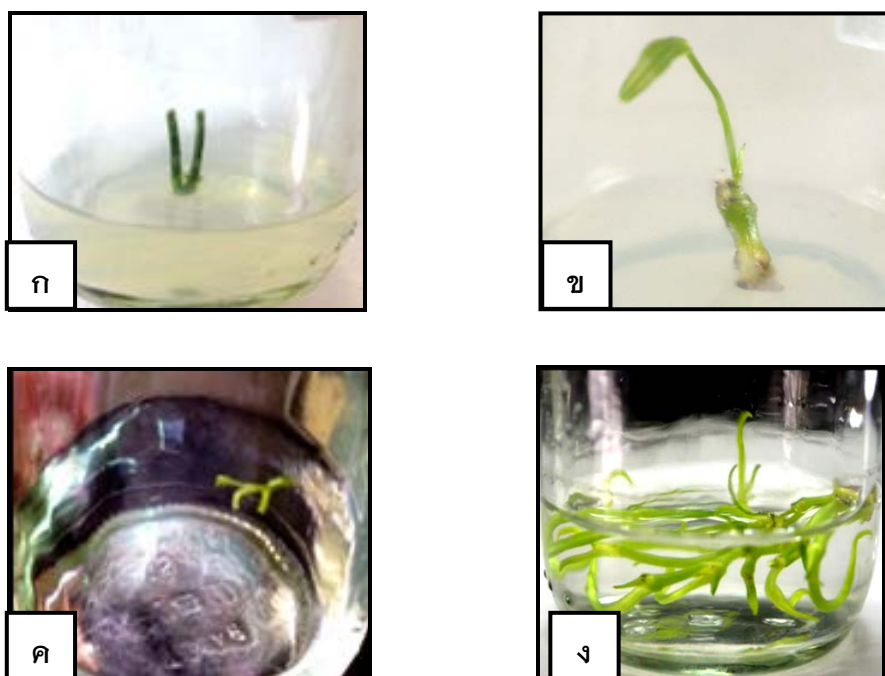
ภาพ 4 แสดง ก) ลักษณะการเกิดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์,
ข) ลักษณะการเกิดแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัส บนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของ BA และ 2, 4-D ที่มีต่อการชักนำขึ้นส่วนของข้อ จากต้นหนอนตายหยากให้ เกิดยอดใหม่จำนวนมาก หลังจากนำขึ้นส่วนของข้อ ที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ย้าย มาเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในระหว่างบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS

ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ และเปรียบเทียบจำนวนยอดที่เกิดขึ้นทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น ของแต่ละสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่า ชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มี BA 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 7.8 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ภาพ 6ง) ส่วนผลการทดลองการชักนำชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า มี BA 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 6.0 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ภาพ 6ข)



ภาพ 6 แสดงลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก

หมายเหตุ: ก) ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS

ข) ลักษณะการเจริญเติบโตของการเกิดยอดใหม่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ค) ลักษณะชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยากที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS

ง) ลักษณะการเจริญเติบโตของการเกิดยอดใหม่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ½ MS ที่มี BA 5 มก./ล. ที่เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 120 รอบ/นาที ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และค่าเฉลี่ยของการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยง
ระหว่างบนอาหารวันสูตร MS และในอาหารเหลว ½ MS ที่เติม BA ร่วมกับ
2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุม การเจริญเติบโต		อาหารวันสูตร MS		อาหารเหลว ½ MS	
2, 4-D (มก./ล.)	BA (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดแคลลัส	ค่าเฉลี่ยของ การเกิดยอด	เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส	ค่าเฉลี่ยของ การเกิดยอด
0	0	0d	3.07±0.153c	0e	4.07±0.330d
	1	0d	4.27±0.228b	7de	7.40±0.542b
	3	40abc	4.53±0.192b	27bcde	5.73±0.502c
	5	40abc	6.00±0.239a	40bcd	9.40±1.055a
0.1	0	33abcd	2.13±0.192d	27cde	2.20±0.460 efg
	1	40abc	2.13±0.192d	60ab	3.00±0.390de
	3	53ab	2.33±0.159d	53abc	3.07±0.267de
	5	60a	2.40±0.131d	81a	2.93±0.267def
0.5	0	7cd	2.40±0.163d	7de	1.52±0.287fg
	1	20bcd	2.00±0.098d	20cde	1.53±0.376fg
	3	40abc	2.20±0.183d	27bcde	1.47±0.291g
	5	40abc	2.07±0.158d	33bcde	2.13±0.456efg
1.0	0	13cd	2.00±0.169d	20cde	1.33±0.361g
	1	13cd	1.93±0.153d	7de	1.40±0.375g
	3	20bcd	2.40±0.131d	20cde	1.13±0.274g
	5	27abcd	2.27±0.118d	27bcde	1.67±0.270efg

หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันทางแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น
95เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี DMRT

จากการวัดความยาวของยอดใหม่ที่เกิดขึ้น พบว่า ชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
½ MS ที่มี BA 5 มก./ล. มีความยาวของต้นประมาณ 8 เซนติเมตร (ภาพ 7ก) และชิ้นส่วนของข้อที่
เพาะเลี้ยงบนอาหารวันสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. มีความยาวของต้นประมาณ 4 เซนติเมตร
(ภาพ 7ข)



ภาพ 7 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของยอดใหม่ที่เกิดขึ้น

- หมายเหตุ: ก) ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นเมื่อย้ายชิ้นส่วนของข้อ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $\frac{1}{2}$ MS ที่มี BA 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
- ข) ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดใหม่ที่เกิดขึ้น ของชิ้นส่วนของข้อ จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวันสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนของข้อ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะนาน 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนของข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว $\frac{1}{2}$ MS ที่มี BA 5 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอด สูงกว่าเพาะเลี้ยงบนอาหารวันสูตร MS ในการทดลองเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อส่งเสริมการเพิ่มจำนวนยอด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารวันสูตร MS มีรายงานจากพืชในวงศ์เดียวกับดาหลา โดยเพาะเลี้ยงส่วนยอดของ *Zingiber zerumbet* Smith บนอาหารวันสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. เพียงชนิดเดียว สามารถชักนำจำนวนยอดได้สูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยของการเกิดยอด คือ 3.60 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (Faridah, et al., 2011) จากผลการศึกษา ถึงแม้ว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดนั้น ต้องการออกซิน และไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสม แต่ในทางปฏิบัตินั้น พบว่า รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของข้อเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก นั้น ส่วนใหญ่มีการเติมไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว โดยไม่ต้องเติมออกซิน ก็สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดได้ดี โดยทั่ว ๆ ไป อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปกติแล้ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำการเกิดยอด (shoot initiation) และเพิ่มจำนวนยอด (shoot multiplication) สามารถใช้อาหารที่มีส่วนประกอบ หรืออาจใช้สูตรอาหารที่ใกล้เคียงกันได้ แต่เนื้อเยื่อ หรือชิ้นส่วน มีความต้องการกระตุ้นจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่แตกต่างกัน พืชส่วนมาก เปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะ ถ้าได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งนี้ ผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน และระดับ หรือสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนิน > ออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด และถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซิน > ไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเกิดราก (เพชรรัตน์ จันทรทิณ, 2556) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนต้นขมิ้นขาว บนอาหารวันสูตร MS ที่เติม NAA ร่วมกับ BA พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารวันสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดจำนวน

ยอด เนลียสูงสุด อยู่ที่ 3.61 ยอดต่อชิ้นส่วน (พันธิตรา กมล, อรุณยานี บุญยประมุข และ อนุพันธ์ กงบังเกิด, 2555.) จากการศึกษางานวิจัยของ เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์ (2556) ได้รายงานผลทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างของเสี้ยวดอกขาว ที่เติม BAP ระดับความเข้มข้น ต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า ที่เติม BAP ความเข้มข้น 5.0 มก./ล. ทำให้มีการเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด แต่ยอดที่ได้ส่วนมาก มีขนาดยาว น้อยกว่า 0.5 ซม. ซึ่งแตกต่างจาก การชักนำยอดจากชิ้นส่วนของข้อต้นหนอนตายหยาก ที่สามารถชักนำการสร้างยอดใหม่ได้จำนวนมาก และยังส่งเสริมการยึดตัวของลำต้น ให้มีความยาวเพิ่มมากขึ้น

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว นิยมใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เนื้อเยื่อโปรโตคอร์ม เนื้อเยื่อเจริญ และปลายยอด เนื้อเยื่อทอลำเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จะไม่ได้รับอิทธิพลจาก แรงโน้มถ่วง การแบ่งเซลล์ และการเจริญ จะรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และจะมีการเจริญออกไปในทุกทิศทาง จากการศึกษา โดยใช้ชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก เป็นบริเวณ ที่มียอด และใบเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ ตามปกติข้อมักจะพองโตกว่าส่วนอื่น ๆ ของลำต้น และเป็นส่วน ที่มีใบติดอยู่ จึงสามารถชักนำการเจริญเติบโตของข้อ ที่สร้างจำนวนยอดแขนงจำนวนมากได้ ซึ่งข้อเหล่านี้ สามารถมาตัดแบ่ง หรือนำไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เพิ่มจำนวนยอดได้ต่อไป และลักษณะของยอดที่ได้จะสมบูรณ์กว่า จะเป็นยอดที่เหมาะสมกับการนำไปชักนำให้เกิดเป็นราก ต่อไป (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

1.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการชักนำชิ้นส่วนของข้อ จากต้นหนอนตายหยาก ให้เกิดเป็นแคลลัส ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

จากผลการศึกษา การชักนำชิ้นส่วนของข้อให้เกิดแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดแคลลัส สูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่มี BA 3 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 2) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในช่วงที่ 1-2 สัปดาห์แรก เริ่มมีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขึ้นมา จากบริเวณชิ้นส่วนของข้อที่ ตัดเป็นชิ้นเล็ก ต่อมาสัปดาห์ที่ 3-4 พบจำนวนของการเกิดแคลลัส ลักษณะเนื้อเยื่อสีเขียวเป็น กลุ่มก้อน เกาะตัวกันเพิ่มขึ้น และมีการพัฒนาเป็นยอดขึ้นมามีเห็นได้ชัด ลักษณะยอดจะเป็น ยอดที่มีขนาดใหญ่ ไม่สูง และไม่มียอด (ภาพ 8) ยอดจะเกิดขึ้นเมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน แต่ไม่แน่นอนเสมอไป ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างออกซิน และไซโทไคนิน การเกิดยอด จากแคลลัส นั้น เกิดได้ในอาหารที่มีออกซินต่ำ และไซโทไคนินสูง BA เป็นไซโทไคนินที่ให้ผลดี ที่สุดตัวหนึ่ง ในการชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส นั้น มีปัจจัยอื่น ๆ เข้ามา เกี่ยวข้องในบางกรณี เกือบความเข้มข้นสูงสามารถชักนำการเกิดยอดได้ (รังสฤษดิ์ การ์ทัศ, 2545) ใน การทดลองของ อุษา พันธุ์ฤทธิ์ดำ (2547) ทำการชักนำชิ้นส่วนของข้อจากโป๊ยเซียนให้เกิด

แคลลัส พบว่า แคลลัสที่มาจากข้อ สามารถเกิดยอดรวมได้ในอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4-D 1.0 มก./ล. สามารถเกิดยอดรวมได้ โดยที่ความเข้มข้น BA 3.0 มก./ล. เกิดยอดรวมมากที่สุด คือ 10.90 ยอดต่อแคลลัส และงานวิจัยของ Fernandes, Novais and Pais (1989) ได้รายงานเช่นกันว่า แคลลัสที่ได้เจริญมาจากปลายยอด ลำต้น ของ *Euphorbia characias* จะมีลักษณะแบบคอมแพค สีเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น แคลลัสที่มีสีเขียวเกิดขึ้นนี้ เพราะมีคลอโรฟิลล์ และปริมาณของคลอโรฟิลล์ จะขึ้นกับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยแสงต่ำ หรือไม่ใช้แสง นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนใช้ภายในเซลล์อีกด้วย ดังนั้น เมื่อขยายระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น เจริญเติบโตพัฒนาเป็นยอดใหม่อย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับการชักนำแคลลัสที่อายุการเพาะเลี้ยงที่ 4 สัปดาห์ เนื่องจากมีอายุการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้น ทำให้เกิดแคลลัสเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดี และในขณะการทดลองของ ชยานิจ ดิษฐบรรจง และคณะ (2551) เมื่อนำแคลลัสที่เกิดจากคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อน และใบอ่อน สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ดี นาน 4 เดือน โดยแคลลัสมีการขยายขนาดขึ้น เป็นเนื้อเยื่อก้อนแข็งสีขาว ต่อมาเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิวของแคลลัสบางส่วน มีกลุ่มเนื้อเยื่อสีขาวทึบ ลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ เจริญออกมา และเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ และเมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือน embryogenic callus จะมีพัฒนาการเป็น somatic embryo จะมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันหลายลักษณะ คือ เจริญเป็น polyembryony 2-3 ต้น อยู่รวมเป็นกระจุก มียอด และราก ที่สมบูรณ์



ภาพ 8 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของการเกิดยอดรวม ของแคลลัสที่มาจากข้อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตาราง 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอน ตายหยากบนอาหารวันสูตร MS ที่มี BA ร่วมกับ 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงบนอาหารวัน MS		8 สัปดาห์	
2, 4-D(มก./ล.)	BA (มก./ล.)	จำนวนที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิด แคลลัส
0	0	0	0c
	1	3	20bc
	3	7	47ab
	5	6	40bc
0.1	0	4	27bc
	1	6	40bc
	3	9	60ab
	5	6	40bc
0.5	0	5	33bc
	1	5	33bc
	3	6	40bc
	5	6	40bc
1	0	4	27bc
	1	4	27bc
	3	6	40bc
	5	6	40bc

หมายเหตุ: เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส คัดจากจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส ต่อจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด 15 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการอยู่รอดชีวิตของแคลลัสหนอนตายหยากในสภาพอาหารคัดเลือก

จากการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่มีต่อการอยู่รอดของแคลลัส โดยใช้เนื้อเยื่อแคลลัสที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนของข้อ จากต้นหนอนตายหยากเลี้ยงในอาหารวันสูตร MS ที่มีสารไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 0, 20, 30, 40, 50 และ 60 มก./ล. ร่วมกับ BA 5 มก./ล. และ 2, 4-D 0.1 มก./ล. ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารวัน ที่เติมไฮโกรมัยซินทุกระดับความเข้มข้น นั้น แคลลัสยังคงมีสีเขียว และสามารถเจริญเติบโตตามปกติ เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวันที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ระดับความเข้มข้น

50 และ 60 มก./ล. แคลลัสบางชิ้นเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีดำ และตายในที่สุด โดยพบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส เท่ากับ 63.3 และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต่อมาสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า สารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน ที่ระดับความเข้มข้น 20, 30 และ 40 มก./ล. แคลลัสเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น โดยพบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส เท่ากับ 40.0, 16.6 และ 13.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า แคลลัสของหนอนตายหยาก ที่เพาะเลี้ยงในอาหารวันสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น ตั้งแต่ 40-60 มก./ล. มีลักษณะเป็นสีดำ และตายทั้งหมด ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 30 มก./ล. ยังคงพบการเจริญเติบโต และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสหนอนตายหยาก เป็น 90.0, 33.33 และ 13.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 4 และภาพ 9 ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ทำให้แคลลัสหนอนตายหยาก ตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 4 คือ ความเข้มข้น 40 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกแคลลัสหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมนั้นอาจขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ขนาดของชิ้นพืช และอายุของพืช (กุลชาติ นาคจันทิก, 2554)

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสหนอนตายหยาก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวัน MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นไฮโกรมัยซิน (mg/l)	สัปดาห์ที่ 1 (เปอร์เซ็นต์)	สัปดาห์ที่ 2 (เปอร์เซ็นต์)	สัปดาห์ที่ 3 (เปอร์เซ็นต์)	สัปดาห์ที่ 4 (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (เปอร์เซ็นต์)
0	100.00	100.00	100.00	90.00	90.00a
20	100.00	93.33	40.00	33.33	33.33b
30	100.00	86.67	16.67	13.33	13.33c
40	100.00	80.00	13.33	0.00	0.00c
50	100.00	63.33	0.00	0.00	0.00c
60	100.00	53.33	0.00	0.00	0.00c

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี DMRT

3. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสม ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหยากโดยใช้แบคทีเรีย *A. tumefaciens*

3.1 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304 โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

เมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1 นำมาเจือจางที่อัตราต่าง ๆ และตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* และยีน *gfp* พบว่า ที่ระดับการเจือจาง 1:1 ระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และในการเลี้ยงแคลลัส ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ระยะเวลา 30 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส จากชุดการทดลองการส่งถ่ายยีนสูงสุด เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระดับการเจือจาง 1:10 ระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และการเลี้ยงแคลลัส ร่วมกับเชื้อ ระยะเวลา 30 นาที อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส จากชุดการทดลองจากการส่งถ่ายยีนสูงสุดเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากความสามารถในการรอดชีวิตของแคลลัสหนอนตายหยาก มีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 (75 เปอร์เซ็นต์) โดยตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสที่ต่ำมากหรือตายไปในที่สุด การรอดชีวิตของแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีการลดลงตามอายุการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้นนั้น อาจเกิดจากการย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าลงสู่อาหารใหม่ (subculture) หลาย ๆ ครั้ง จะทำให้ความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อนั้นลดลง หรือหายไปได้ (ภาพ 10 และตาราง 5) ซึ่งความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนแตกต่างกันด้วย เนื่องจากปริมาณเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มาก จะทำให้เซลล์พืชมีโอกาสถูกบุกรุก (infect) ด้วยเชื้อเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้าเชื้อมีมากเกินไป อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์พืชได้ ในขณะเดียวกัน ปริมาณเชื้อที่น้อยเกินไป อาจทำให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนลดลง (Yong, Abdullah and Mahmood, 2006) และจากผลศึกษาของ เกศณี มณีภาส (2546) ที่ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (OD₆₀₀ = 0.6-0.8) เจือจางอัตราส่วน ดังนี้ 1:1, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 และ 1:500 ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และพันธุ์วิเอฟ 134-1-2 พบว่า ที่อัตราส่วน 1:10 ให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงสุด เท่ากับ 53.67 และ 49.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจะแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ *A. tumefaciens* ที่มาก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน แต่ปริมาณเชื้อที่มากเกินไป จะทำให้การกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อพืชทำได้ยาก ส่งผลอันตรายกับเนื้อเยื่อพืชได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดลองหาปริมาณเชื้อ ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด



ภาพ 10 แสดงลักษณะการเจริญของต้นหนอนตายหยากที่รอดชีวิตจากการส่งถ่ายยีนในสภาวะที่เหมาะสม ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ระดับการเจือจาง 1:1 ระดับความเข้มข้นของสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างชิ้นส่วนพืชกับเชื้อแบคทีเรีย (co-cultivation period) 30 นาที ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลาทั้งหมด 4 สัปดาห์

ตาราง 5 แสดงผลของระดับการเจือจางของเซลล์แขวนลอยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียในความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นของสาร acetosyringone และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังจากการส่งถ่ายยีน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

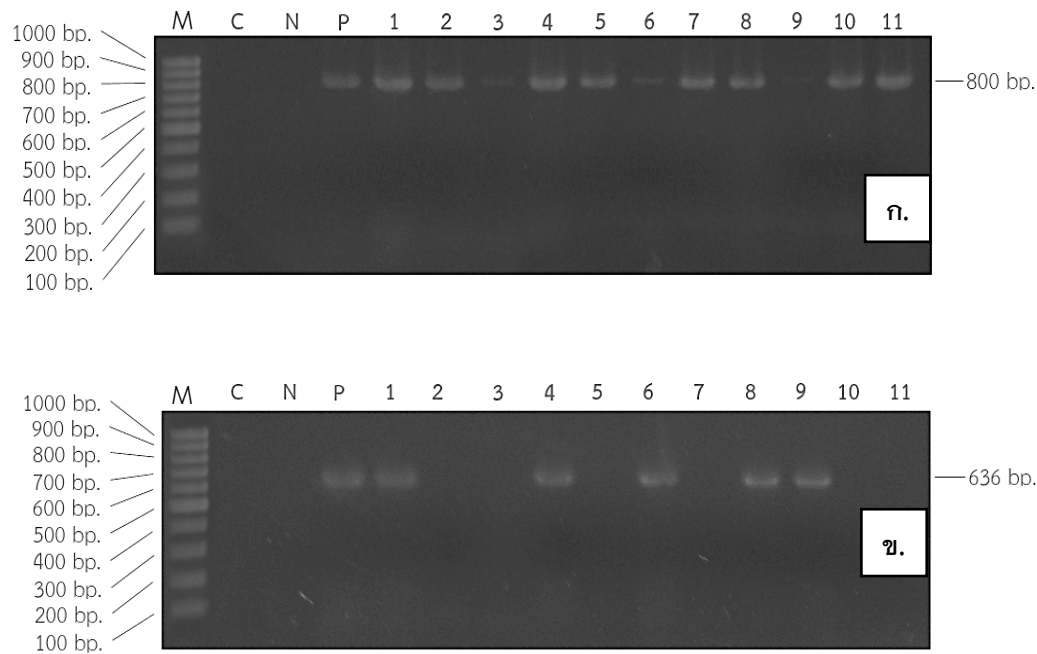
ระดับการเจือจางของ เซลล์แขวนลอยเชื้ออะ โกรแบคทีเรีย	ระยะเวลาที่ใช้ ปลูกเชื้อบน แคลลัส (นาที)	ความเข้มข้นของ acetosyringone (ไมโครโมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การรอด ชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
1:1	30	100	55.00a
		200	10.00b
1:1	60	100	10.00b
		200	10.00b
1:10	30	100	40.00a
		200	0.00b
1:10	60	100	0.00b
		200	0.00b

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี DMRT

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน ระหว่างชิ้นส่วนพืช กับเชื้อแบคทีเรีย (co-cultivation period) นั้น เป็นปัจจัยที่สำคัญ ในการช่วยให้เกิดกลไกการส่งถ่ายยีน จากอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืช (Yong, Abdullah and Mahmood, 2006) การปลูกเชื้อเป็นขั้นตอนที่ช่วยให้เชื้อ *A. tumefaciens* เข้ายึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืชได้ (Batra and Kumar, 2003); (Yong, Abdullah and Mahmood, 2006) จากการทดลองปลูกเชื้อบนแคลลัสหนอนตายหยากที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า ที่ระยะเวลา 30 นาที พบว่า แคลลัสสามารถรอดชีวิตหลังจากการส่งถ่ายยีน จำนวนทั้งหมด 11 โคลน คิดเป็นร้อยละ เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 5) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Batra and Kumar (2003) ที่ปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* (LBA4404/pCAMBIA1301) ร่วมกับ embryogenic calli ของหญ้า buffel 3 พันธุ์ ได้แก่ IG-3108, IG-9757 และ IG-97101 พบว่า ที่ระยะ เวลา 30 นาที มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงสุดในทั้ง 3 พันธุ์ เท่ากับ 76.7, 76.7 และ 86.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองของ Yong, et al. (2006) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ประกอบด้วย พลาสมิด pCAMBIA1304 ที่มียีน *gfp* เป็นยีนรายงานผล ปลูกเชื้อให้กับ *Melastomataceae malabathricum* และ *Tibouchina semidecandra* ซึ่งพบว่า การปลูกเชื้อที่ระยะเวลานาน 60 นาที มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gfp* สูงสุด โดยปกติแล้วในพืชแต่ละชนิด มีระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่เหมาะสมแตกต่างกันไป เช่น การปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* กับใบเลี้ยงถั่วเหลือง ใช้ระยะเวลา 30 นาที (Chakrabarty, et al., 2002)

3.2 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และยีน *gfp* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction)

จากการนำแคลลัสที่รอดชีวิต หลังจากการส่งถ่ายยีน และเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ นำมาสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสหนอนตายหยากที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก และแคลลัสหนอนตายหยากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* จะเกิดการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่มีขนาด 800 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *gfp* ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 636 คู่เบส จากนั้น นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบ พบแถบดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพ 11) ในจำนวนแคลลัสทั้งหมด 20 แคลลัส พบว่า มีแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากการส่งถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก ระยะเวลา 4 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 11 แคลลัส และเมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของยีน *hpt* ปรากฏว่า พบแถบดีเอ็นเอในทุกโคลนที่มีชีวิตอยู่จำนวน 11 ตัวอย่าง (ภาพ 11ก) และพบแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* จำนวน 5 โคลน อีกจำนวน 6 โคลน ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* (ภาพ 11ข)



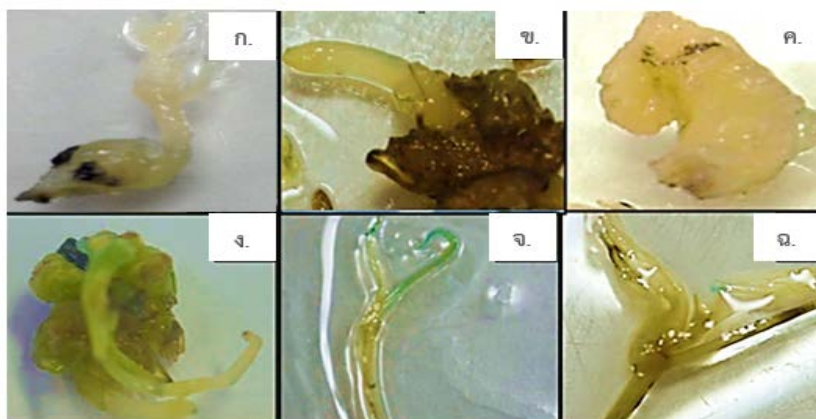
ภาพ 11 แสดงการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* และยีน *gfp* ในแคลลัสหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1304 โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ก) ไพร์เมอร์ HPT-2 Forward และ HPT-2 Reverse จำเพาะต่อยีนต้านทาน *hpt* เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาด 800 คู่เบส และไพร์เมอร์ *gfp*-Forward และ *gfp*-Reverse จำเพาะต่อยีน *gfp* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 636 คู่เบส

ข) เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder เลน C (control) คือ ไม่ใส่ ดีเอ็นเอแม่แบบ เลน N (negative control) คือ ดีเอ็นเอแม่แบบของแคลลัสหนอนตายหยากที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน เลน P (positive control) คือ ดีเอ็นเอแม่แบบจากพลาสมิด pCAMBIA 1304 และ เลน 1 – 11 คือ ดีเอ็นเอแม่แบบจากแคลลัสหนอนตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยีน

3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS Histochemical assay

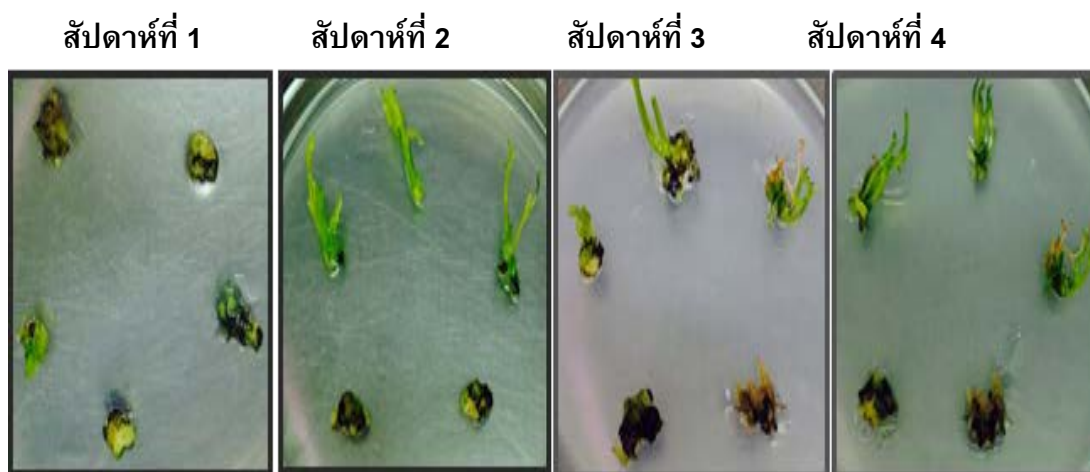
การแสดงออกของยีน *gus* จากการติดสีน้ำเงิน ภายในชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนจากการทดลอง พบว่า การใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (OD600 = 1) ที่เจือจางอัตรา 1:1 (สารแขวนลอยแบคทีเรีย: อาหารเหลว MS) ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 30 นาที และการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับแคลลัสหนอนตายหยาก นาน 3 วัน สามารถส่งถ่ายยีน *gus* เข้าไปในเนื้อเยื่อแคลลัสได้ ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด โดยเห็นได้จากการติดสีน้ำเงินในชิ้นเนื้อเยื่อพืช ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ภาพ 12)



ภาพ 12 แสดงลักษณะการติดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1304 ด้วยวิธี GUS Histochemical assay นาน 24 ชั่วโมง
 ก) ลักษณะสีของแคลลัสที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (control) ข-ฉ ลักษณะย้อมติดสีน้ำเงินในแคลลัสที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ของโคลนที่ 1, 4, 6, 8 และ 9

4. การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1304/ STS โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

จากการส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยาก โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1304/STS นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ซึ่งประกอบด้วยอาหารรุ้นสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. และเติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 300 มก./ล. ร่วมกับสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 40 มก./ล. เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่า ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้แคลลัสที่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 31 โคลน จากแคลลัสทั้งหมดที่ใช้ส่งถ่ายยีน จำนวน 60 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช จากการสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสในช่วงสัปดาห์แรก เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน ต่อมาในช่วงสัปดาห์ที่ 2 แคลลัสบางชิ้น เริ่มมีการเจริญเกิดเป็นยอดใหม่ขึ้นมา เมื่อเข้าสู่ช่วงสัปดาห์ที่ 3 แคลลัสบางชิ้นส่วน เริ่มไม่มีการเจริญบนอาหารสูตรคัดเลือกโดยมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล แต่แคลลัสบางชิ้น ก็สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ดี ซึ่งลักษณะเป็นเนื้อเยื่อสีเขียว และเกิดยอดใหม่ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสบางชิ้นที่รอดจากการส่งถ่ายยีนเริ่มเจริญเติบโต เกิดเป็นยอดใหม่อย่างเห็นได้ชัด และแคลลัสบางชิ้นที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนเนื้อเยื่อมีลักษณะสีเทา และดำ ในที่สุดก็ตาย (ภาพ 13)



ภาพ 13 แสดงลักษณะการเจริญของแคลลัสที่รอดชีวิตจากการส่งถ่ายพลาสมิด pCambia 1304 ในสภาวะมีด เป็นระยะเวลาทั้งหมด 4 สัปดาห์

5. ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และยีน *gfp* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction)

สกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสหนอนตายหยาก ที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกและแคลลัสหนอนตายหยาก ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hpt* และยีน *gfp* จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบ พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพ 14ก) และปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gfp* ขนาด 636 คู่เบส (ภาพ 14ข) ซึ่งจากการตรวจสอบแคลลัสหนอนตายหยาก ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน จำนวน 31 โคลน พบโคลนที่มียีน *hpt* จำนวน 28 โคลน ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hpt* จำนวน 3 โคลน และพบโคลนที่มียีน *gfp* จำนวน 18 โคลน ไม่พบยีน *gfp* จำนวน 13 โคลน (ตาราง 6) อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกอายุ 4 สัปดาห์ เมื่อนำมาตรวจสอบการมีของยีน *hpt* และยีน *gfp* ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเนื้อเยื่อบางส่วนของแคลลัส ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสอง ในกรณีที่ไม่พบยีน *hpt* แต่แคลลัสสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ อาจเกิดจากระหว่างการคัดเลือกแคลลัสจากการส่งถ่ายยีนแคลลัสที่มีความหนาพอสมควร จึงอาจมีเนื้อเยื่อบางส่วนไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ดังนั้น ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมายซินที่เคลื่อนย้ายเข้าไปในเนื้อเยื่อเหล่านี้ อาจเจือจางลง ทำให้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนได้หมด เซลล์จึงเจริญขึ้นมาได้บนอาหารคัดเลือก นอกจากนี้ ที่ไม่พบยีน *gfp* เนื่องจากยีน *gfp* ที่ใช้ศึกษา อยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ CaMV35S ทำให้ยีน *gfp* มีการแสดงออกในชิ้นส่วนแบบไม่จำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ อาจเกิดจากความไม่เสถียรของ T-DNA ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ (rearrangement) ของลำดับเบสที่อยู่บน T-DNA ซึ่ง

อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของยีน *gfp* หรือยีน *hpt* ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ โดยวิธีพีซีอาร์ (สมนา เหลืองจิติกานูจนา, 2550)

ตาราง 6 แสดงผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* ยีน *gfp* และ ยีน *STS* จ ำ ก
แคล์สหนองตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยีน จำนวน 31 โคลน ด้วยเทคนิคพีซี
อาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *hpt* ยีน *gfp* และยีน *STS*

โคลนแคล์ส หนองตายหยากที่รอด ชีวิตจากการส่งถ่ายยีน	PCR: ยีน <i>hpt</i>	PCR: ยีน <i>gfp</i>	PCR: ยีน <i>STS</i>	การย้อมติด สีน้ำเงิน <i>gus assay</i>
1	+	-	-	X
2	+	-	-	X
3	+	+	+	√
4	+	-	-	X
5	+	-	-	X
6	+	-	-	X
7	+	+	+	√
8	+	-	-	X
9	+	+	+	√
10	+	-	-	X
11	+	+	+	√
12	+	-	-	X
13	+	-	-	X
14	+	+	+	√
15	+	+	+	√
16	-	-	-	X
17	+	+	+	√
18	+	+	+	√
19	-	-	-	X
20	+	+	+	√
21	+	+	+	√
22	+	+	+	√
23	+	+	+	√
24	-	-	-	X
25	+	+	+	√

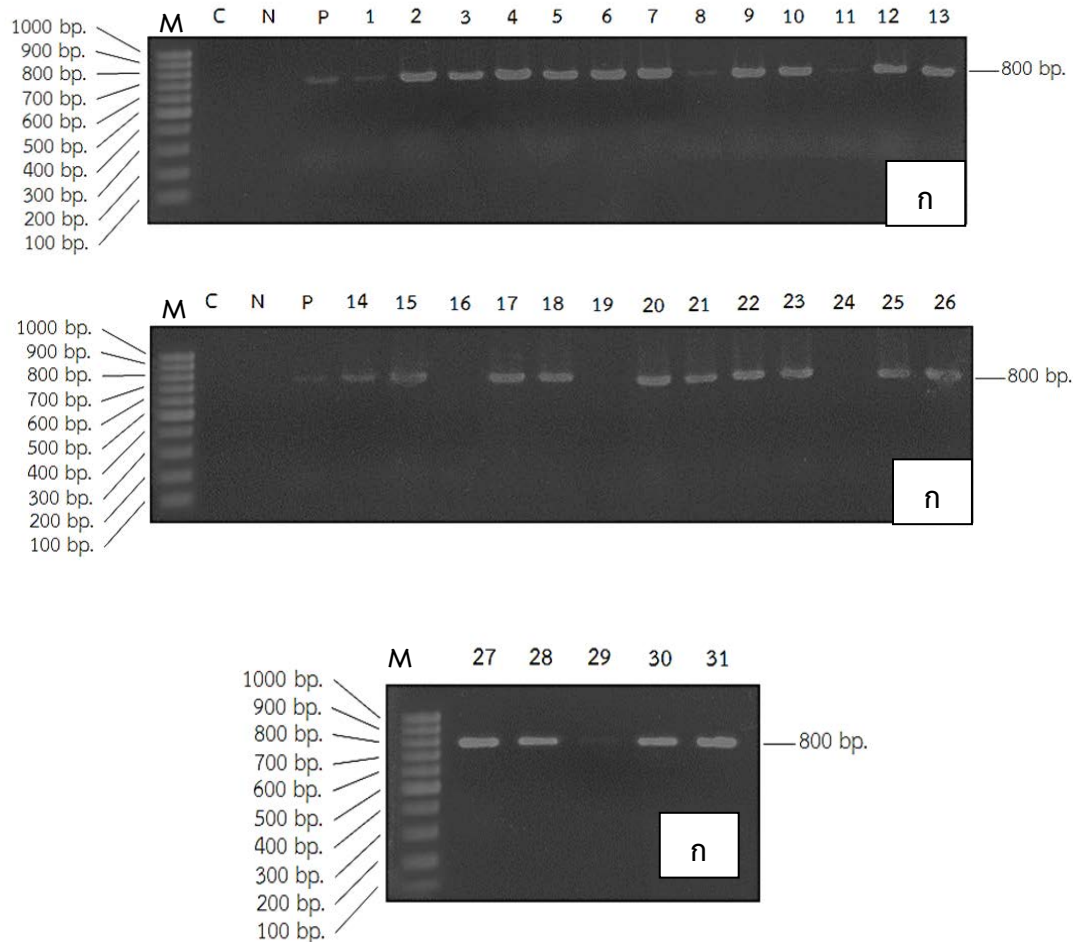
โคลนแคลลัส หนอนตายหยากที่รอด ชีวิตจากการส่งถ่ายยีน	PCR: ยีน <i>hpt</i>	PCR: ยีน <i>gfp</i>	PCR: ยีน <i>STS</i>	การย้อมติด สีน้ำเงิน <i>gus assay</i>
26	+	+	+	√
27	+	+	+	√
28	+	-	-	X
29	+	+	+	√
30	+	+	+	√
31	+	+	+	√

หมายเหตุ: -หมายถึง ไม่มีแถบดีเอ็นเอ

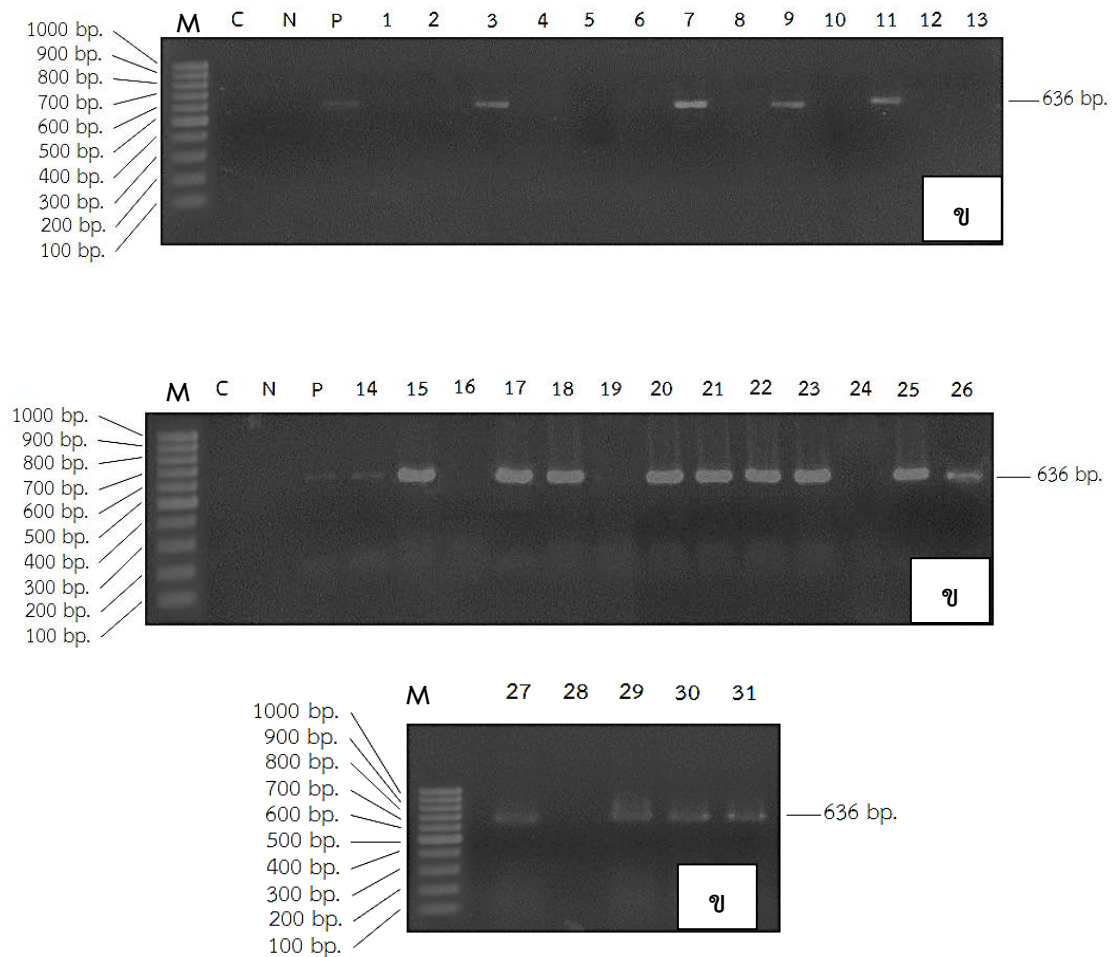
+ หมายถึง พบแถบดีเอ็นเอ

√ หมายถึง แคลลัสเกิดจุดสีน้ำเงิน

X หมายถึง แคลลัสไม่เกิดจุดสีน้ำเงิน



ภาพ 14 แสดงการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทาน *hpt* ในแคลลัสหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่าย ยีน STS โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ใช้ไพรเมอร์ *HPT-2* Forward และ *HPT-2* Reverse ที่จำเพาะต่อยีนต้านทาน *hpt* ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 800 คู่เบส (ก) โดย เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder เลน C (control) คือ ไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ เลน N (negative control) คือดีเอ็นเอแม่แบบของ แคลลัสหนอนตายหยากที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน เลน P (positive control) คือ ดีเอ็นเอ แม่แบบจากพลาสมิด pCAMBIA1304/STS และ เลน 1 – 31 คือ ดีเอ็นเอแม่แบบจาก แคลลัสหนอนตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยีน STS โคลนที่ 1-31 ตามลำดับ

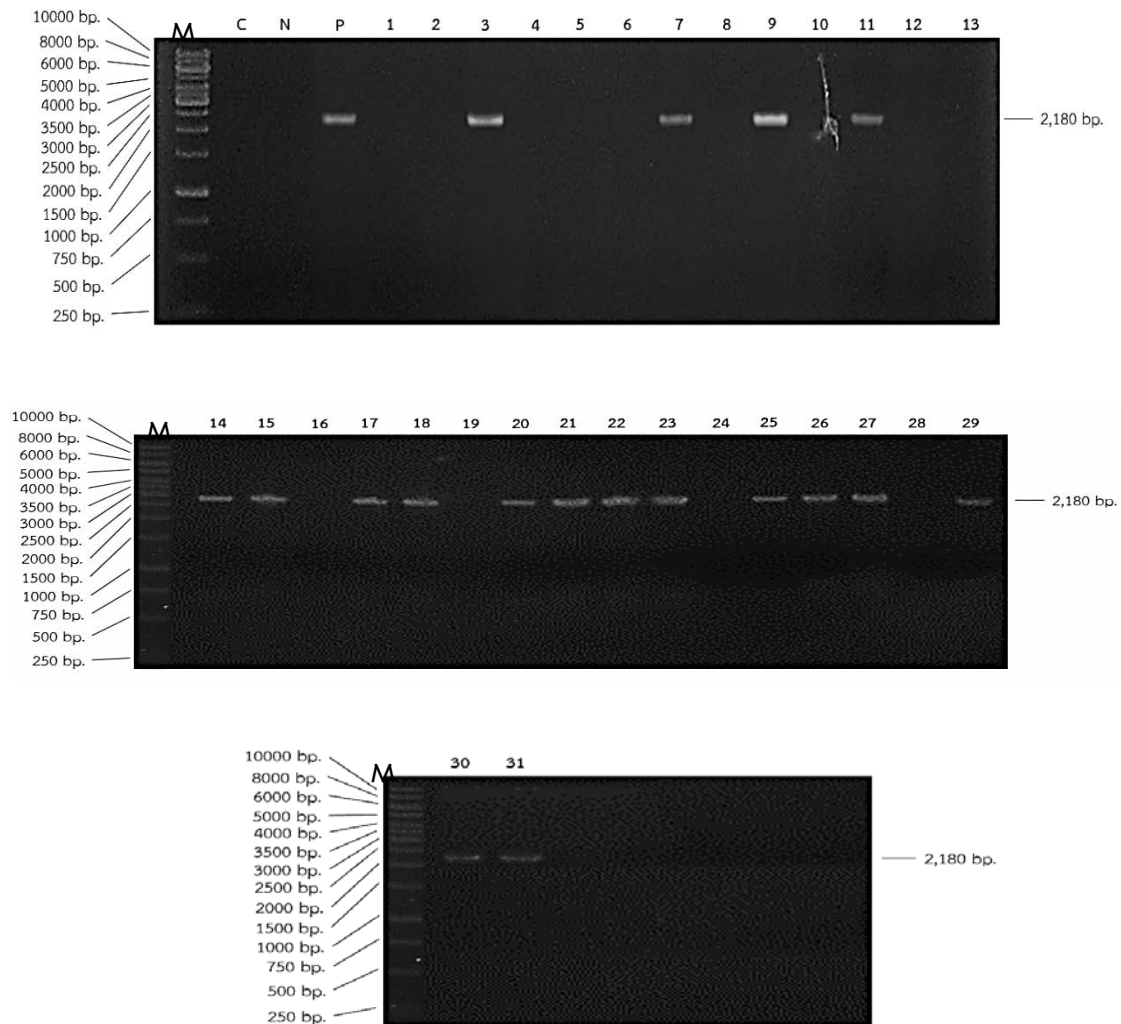


ภาพ 15 แสดงการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gfp* ในแคลลัสหนอนตายหยาก ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *STS* โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ HA105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ใช้ไพรเมอร์ *gfp*-Forward และ *gfp*-Reverse จำเพาะต่อยีน *gfp* ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 636 คู่เบส (ข) โดย เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder เลน C (control) คือ ไม่ใส่ ดีเอ็นเอแม่แบบ เลน N (negative control) คือ ดีเอ็นเอแม่แบบของแคลลัสหนอนตายหยากที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน เลน P (positive control) คือ ดีเอ็นเอแม่แบบจากพลาสมิด pCAMBIA1304/STS และ เลน 1 – 31 คือ ดีเอ็นเอแม่แบบจากแคลลัสหนอนตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยีน *STS* โคลนที่ 1-31 ตามลำดับ

6. ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน STS ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน STS โดยคัดเลือกตรวจสอบกับแคลลัสหนอนตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยีนในโคลนที่ 1-31 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดและสร้างเป็น 1st cDNA และนำมาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีความจำเพาะกับการเพิ่มจำนวนยีน STS จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis ในอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของยีน STS ขนาด 2,180 คู่เบส ซึ่งจากการตรวจสอบแคลลัสหนอนตายหยาก ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน จำนวน 31 โคลน พบโคลนที่มียีน STS จำนวน 18 โคลน และโคลนที่ไม่มียีน STS จำนวน 13 โคลน (ตาราง 6 และภาพ 16)

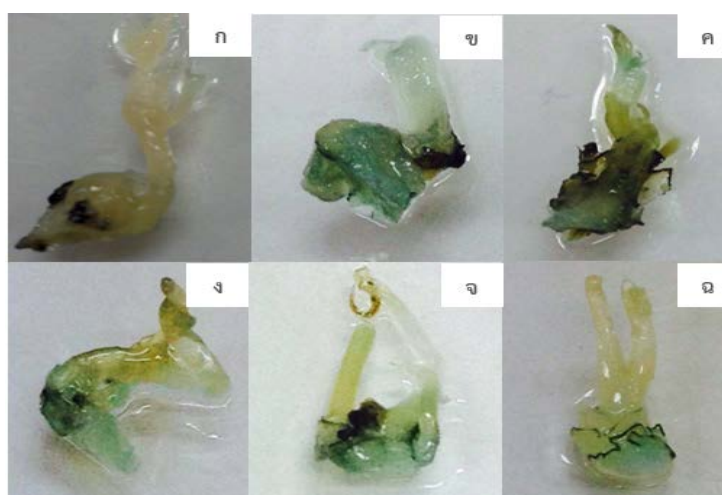
สำหรับโคลนที่ตรวจสอบแล้วในบางแคลลัส พบการมีอยู่ของยีน *hpt* เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน STS และยีน *gfp* นั้น อาจเนื่องจากในกระบวนการส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A. tumefaciens* นั้น การแทรกตัวของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืชนั้น มักนำส่วน right border เข้าสู่จีโนมก่อน พลาสมิด pCAMBIA1304/ STS ที่ใช้ในการทดลองนี้ มียีน *gfp* เป็นยีนรายงานผลที่อยู่บริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งเป็นด้านที่ย้ายเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซมของเซลล์พืชก่อน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ส่วนของยีน STS ที่อยู่ทางด้าน left border ของ T-DNA อาจเกิดการขาดหายไป ระหว่างการส่งถ่ายยีน จึงทำให้ไม่พบการมีอยู่ของยีน STS (กุลชาติ นาคจันทิก, 2554)



ภาพ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน STS ในแคลลัสหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ใช้ไพรเมอร์ RTFSTSc6 Forward และ gfp Reverse โดยแถบดีเอ็นเอของยีน STS มีขนาด 2,180 คู่เบส: เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1KB DNA Ladder เลน C (control) คือ ไม่ใส่ ดีเอ็นเอแม่แบบ เลน N (negative control) คือ แม่แบบจาก cDNA ของแคลลัสหนอนตายหยากที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน เลน P (positive control) คือ ดีเอ็นเอพลาสมิด pCAMBIA1304/STS และ เลน 1 - 31 คือ แม่แบบจาก 1st cDNA แคลลัสหนอนตายหยากที่ผ่านการส่งถ่ายยีน STS โคลน 1-31 ตามลำดับ

7. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS Histochemical assay

จากการทดลอง พบว่า การใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (OD600 = 1) ที่เจือจางอัตรา 1:1 (สารแขวนลอยแบคทีเรีย: อาหารเหลว MS) ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนาน 30 นาที และการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับแคลลัสหนอนตายหยาก นาน 3 วัน ลักษณะการติดสีของแคลลัสบางชิ้นนั้น ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อเยื่อที่มีการติดสีน้ำเงิน เป็นลักษณะของจุดปะเล็ก ๆ กระจายอยู่ และจะมีบริเวณที่ติดเข้มเป็นบางจุด และพบอีกว่า ไม่ติดสีน้ำเงินที่บริเวณส่วนของท่อลำเลียง ดังนั้น การแสดงออกของยีน *gus* สามารถส่งถ่ายยีน *gus* เข้าไปในเนื้อเยื่อแคลลัสได้ ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด (ภาพ 17)



ภาพ 18 แสดงลักษณะการติดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีน STS ด้วยวิธี GUS Histochemical assay นาน 24 ชั่วโมง ก ลักษณะสีของแคลลัสที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (control) ข-ฉ ลักษณะย้อมติดสีน้ำเงินในแคลลัสที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ของโคลนที่ 3, 7, 9, 11 และ 14

8. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ ในกลุ่ม pinosylvin ในต้นหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *Stilbene synthase like gene* (STS)

8.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics compound) ในต้นหนอนตายหยากที่ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน STS *hpt* และยีน *gfp* รวมถึงการย้อมติดสีน้ำเงิน *gus* ที่เห็นลักษณะเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงิน จากทั้งหมด 18 ตัวอย่าง โดยเรียกชื่อตัวอย่างต้นหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ด้วย STS ตามด้วยเลขลำดับของโคลน ดังนี้ การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์จึงประกอบด้วยตัวอย่าง STS /3, STS /7, STS /9, STS /11, STS /14, STS /15, STS /17, STS /18, STS /20, STS /21, STS /22, STS /23, STS /25, STS /26, STS /27, STS /29, STS /30, STS /31 และ Control คือ ต้นหนอนตายหยาก ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน Negative control คือ ต้นหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่าย พลาสมิด pCAMBIA 1304 โดยวิเคราะห์

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และพิจารณาจาก การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ได้สมการ ดังนี้ $y = 0.0041 x$, ($R^2 = 0.9944$) พบว่า ต้นหนอนตายหยาก โคลนที่ STS/17, STS/25, STS/18 และ STS/21 มีปริมาณสารฟีนอลิกสูง คือ 83.70, 81.26, 80.41 และ 79.35 มิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในต้นหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่ายยีนของแต่ละโคลน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตาราง 7)

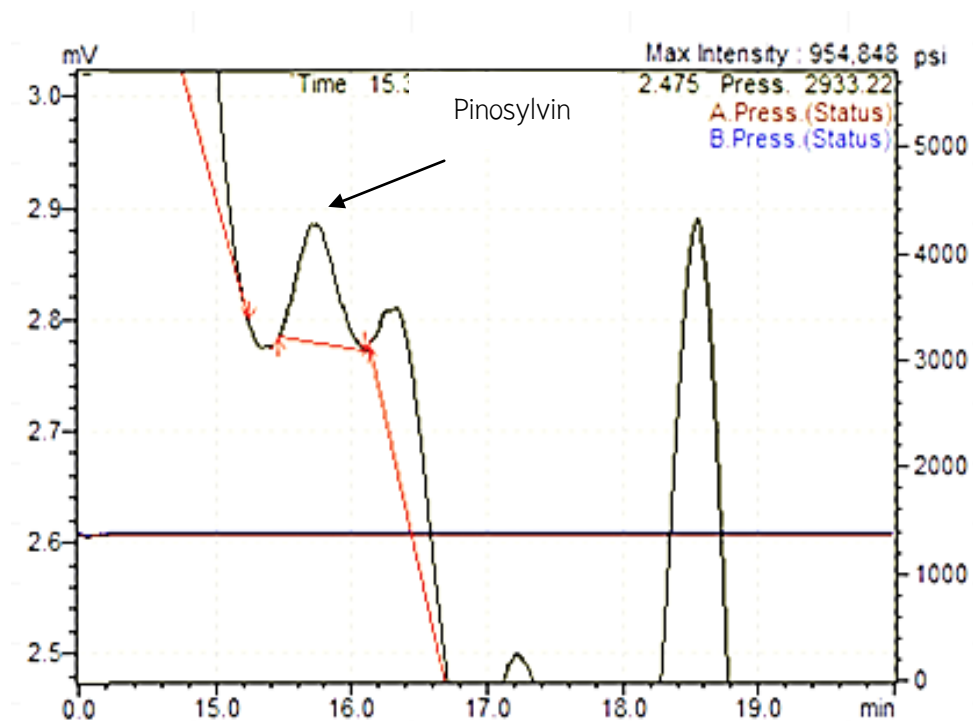
ตาราง 7 แสดงปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ในหนอนตายหยากที่รอดชีวิตจากการส่งถ่ายยีน STS ระยะเวลา 4 สัปดาห์

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในต้นหนอนตายหยาก ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$)
Control	38.33 $\pm$ 4.44h
Negative control	56.18 $\pm$ 4.64g
STS /3	71.59 $\pm$ 3.69d
STS /7	65.12 $\pm$ 5.19ef
STS /9	71.34 $\pm$ 1.66d
STS /11	69.15 $\pm$ 2.62de
STS /14	65.73 $\pm$ 4.25ef
STS /15	74.43 $\pm$ 3.51cd
STS /17	83.70 $\pm$ 5.44a
STS /18	80.41 $\pm$ 4.17ab
STS /20	72.32 $\pm$ 1.75d
STS /21	79.35 $\pm$ 5.15abc
STS /22	65.73 $\pm$ 4.50ef
STS /23	74.27 $\pm$ 6.81cd
STS /25	81.26 $\pm$ 5.02ab
STS /26	78.25 $\pm$ 4.19bc
STS /27	72.97 $\pm$ 4.58d
STS /29	68.98 $\pm$ 2.63de
STS /30	64.15 $\pm$ 2.83ef
STS /31	63.13 $\pm$ 2.83f

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

8.2 การสกัด และวิเคราะห์ปริมาณสาร pinosylvin ในต้นหนอนตายหยากที่ได้รับการส่งถ่าย ยีน *Stilbene synthase like gene (STS)* ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณ pinosylvin เพื่อนำมาใช้เป็นตัวแทนของสารกลุ่ม stilbenoid ในหนอนตายหยาก โดยเลือกตัวอย่างจากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ในหนอนตายหยาก ที่มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 72.97-83.70 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด มาตรวจวัดปริมาณสาร pinosylvin จำนวน 8 ตัวอย่าง ดังนี้ STS/27, STS/23, STS/15, STS/26, STS/21, STS/18, STS/25 และ STS/17 เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร pinosylvin โดยเครื่อง HPLC พบว่า มีตัวอย่าง 4 โคลนที่มีปริมาณสาร pinosylvin สูงกว่า ตัวอย่าง control และ negative control ดังนี้ ตัวอย่าง STS/17, STS/18, STS/25 และ STS/21 คือ 6.66, 2.66, 2.62 และ 2.04 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบปริมาณสาร ยังคงต้องมีการศึกษาวิธี การวิเคราะห์ปริมาณสาร ในขั้นตอนที่เหมาะสมกับ ตัวอย่าง ที่ตรวจวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลว ความดันสูง มักจะ แสดงออกมาในรูปแบบของการแยกสารที่ต้องการไม่ได้ หรือแยกไม่ดี เกิดจากหลายสาเหตุ เช่น Peak กว้าง สาเหตุเกิดจากใส่สารตัวอย่างมากเกินไป ควรแก้ไขโดยเจือจางสารตัวอย่าง ฉีดสาร ตัวอย่างมากเกินไป ควรลดปริมาณสารตัวอย่างลง ประสิทธิภาพของคอลัมน์ไม่ดี มีเวลาหน่วง (retention time) นานเกินไป และเฟสเคลื่อนที่หนืดเกินไป รวมไปถึงอาจมีสารอื่นเจือปนลงไปอยู่ในคอลัมน์ ทำให้ไม่พบปริมาณสารที่ต้องการ ดังนั้น ควรมีการปรับปรุง ดัดแปลง เพื่อให้เครื่องมือสามารถ ตรวจวัดปริมาณสารอื่น ๆ ได้มากขึ้น (ภาพ 18 และตาราง 8)



ภาพ 18 แสดง Chromatogram ของสารสกัด pinosylvlin ในต้นหนอนตายหยากโคลน STS/17 และจากตรวจสอบหาปริมาณ pinosylvlin ของสารสกัดจากตัวอย่าง พบ pinosylvlin ต่อต้นสดของหนอนตายหยาก (ng/g)

ตาราง 8 แสดงค่าเฉลี่ย $\bar{X}$ ของปริมาณ pinosylvin จากต้นหนอนตายหายาก บางตัวอย่าง ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน STS

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณสาร pinosylvin (ng/g ต้นตัวอย่าง)		
	สารสกัด ครั้งที่ 1	สารสกัด ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
control	1.69	1.39	1.54
Negative control	1.85	1.47	1.66
STS/17	8.00	5.33	6.67
STS/25	2.80	2.52	2.66
STS/18	1.48	3.76	2.62
STS/21	1.96	2.04	2.00
STS/26	0.00	0.00	0.00
STS/15	0.00	0.00	0.00
STS/23	0.00	0.00	0.00
STS/27	0.00	0.00	0.00

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และยอดจำนวนมาก ในการทดลองใช้ชิ้นส่วนของข้อจากต้นหนอนตายหยาก โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS และในอาหารเหลว 1/2 MS เป็นระยะเวลา นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารเหลว 1/2 MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของข้อ มากที่สุด โดยมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ ได้ดีสุด ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA 5 มก./ล. โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุด คือ 7.8 ยอดต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ส่วนผลการเกิดแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตร MS พบว่า ในอาหารที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารที่มี BA 5 มก./ล. ให้ค่าเฉลี่ยของการเกิดยอด อยู่ที่ 6.0 ยอด ต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และเมื่อขยายระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัส บนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA 5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์ของเกิดแคลลัสสูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ที่มี BA 3 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D 0.1 มก./ล. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 60 เปอร์เซ็นต์

อิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการรอดชีวิตของแคลลัส พบว่า ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัส คือ 40 มก./ล. มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และอัตราการตายของแคลลัสตาย เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ จากการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยาก โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่ประกอบด้วย พลาสมิด pCAMBIA1304 เป็นตัวกลางในการส่งถ่าย โดยศึกษาประสิทธิภาพความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อ ความเข้มข้นของสาร acetosyringone และระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนพืชกับเชื้อที่มีผลต่อความสำเร็จ ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยาก จากการศึกษา พบว่า ระดับการเจือจางของเซลล์แขวนลอยเชื้อ 1:1 ที่เพิ่มความเข้มข้นของสาร acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครลาร์ และระยะเวลาที่ใช้ปลูกเชื้อบนแคลลัส 30 นาที เหมาะสมที่จะนำไปใช้คัดเลือกแคลลัส ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสูงสุดร้อยละ เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีน เข้าสู่แคลลัสหนอนตายหยากมากที่สุด ในการศึกษาการส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัสของหนอนตายหยาก โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304/STS และมียีน *hpt* เป็นยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก พบว่า มีแคลลัสที่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 31 โคลน คิดเป็นร้อยละ 52 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำแคลลัสที่ได้มาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบโคลนที่มียีน STS จำนวน 18 โคลน คิดเป็นร้อยละ 30 เปอร์เซ็นต์ อีกจำนวน 13 โคลน ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน STS

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics compound) จากการส่งถ่ายยีน STS จากตัวอย่าง ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง พบว่า ต้นหนอนตายหยากของยีน STS โคลนที่ 17 มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด คือ 83.70 มิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และมีปริมาณสาร pinosylvin สูง คือ 6.66 นาโนกรัม/กรัมน้ำหนักสด

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน STS เข้าสู่แคลลัส หนอนตายหยาก ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการส่งถ่ายยีน และนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างปริมาณสารออกฤทธิ์ในหนอนตายหยาก และพัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดต้นอย่างมีประสิทธิภาพภายหลังจากการส่งถ่ายยีน เช่น การเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายยีน โดยเลือกเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ รวมทั้งศึกษาชนิด และสูตรอาหารที่ชักนำให้เนื้อเยื่อเป้าหมายเกิดต้นใหม่ได้ดี หรือผลกระทบทางชีวเคมีภายในต้นหนอนตายหยากหลังได้รับการส่งถ่ายยีน เป็นต้น การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง ที่มีบทบาทต่อความสำเร็จ คือ การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง สภาพทางพันธุกรรมพืช หรือ genotype ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อพฤติกรรมการเจริญเติบโต พืชที่มีการเติบโตช้าหรือขยายพันธุ์ได้ง่าย ในธรรมชาติ จะยังคงมีการเจริญเติบโตช้าในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากเทคนิคดังกล่าว เป็นเพียงแค่เพิ่มประสิทธิภาพของความสามารถต่าง ๆ ที่มีอยู่ในพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่มีพันธุกรรมต่างกันจะให้ผลต่างกันเสมอ ในการเตรียมเนื้อเยื่อพืชจะพิจารณาคุณสมบัติต่าง ๆ ของพืช ที่สามารถจะนำมาใช้ได้ เช่น ดอก ใบ ตายอด ตาข้าง ราก ลำต้น เมล็ด เป็นต้น ดังนั้น ควรพิจารณาเลือกชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยง เช่น ขนาดของชิ้นส่วน ขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุด ที่มีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งที่ควรพิจารณา เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง เท่ากับเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ ในทางปฏิบัติ นิยมเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กหลาย ๆ ชิ้น รวมกันในขวดเดียวกัน เพื่อกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้น โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งจะโตเร็วกว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพียงชิ้นเดียว และรวมไปถึงชนิดของชิ้นส่วนของพืช ความสามารถในการเจริญเติบโตนั้น อาจแตกต่างกันไป เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว (active) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ซึ่งพบได้ในส่วนต่าง ๆ ดังนี้ ส่วนปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่เซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด ส่วนนี้ นับจากปลายยอดสุดลงมา ไม่เกิน 5 มิลลิเมตร เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในส่วนของลำต้น และราก ซึ่งอยู่ระหว่างกลุ่มของท่ออาหาร และท่อน้ำ เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) ซึ่งจะพบในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว ทำหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง เป็นต้น (เพชรรัตน์ จันทรทิณ, 2556)

การศึกษาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โดยการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิในหนอนตายหยากยังควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อที่ก่อให้เกิดความเข้าใจในเชิงลึกมากขึ้น โดยต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญในเรื่องการวิเคราะห์แยกประเภทหรือชนิดขององค์ประกอบสารในกลุ่ม stilbenoid เนื่องจากผลการส่งถ่ายยีนในครั้งนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบสารชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่ม stilbenoid ได้ โดยได้ใช้สาร pinosylvin เป็นตัวอย่างอ้างอิงชนิดเดียวเพราะสามารถหาซื้อได้จากบริษัทในต่างประเทศ ถ้าสามารถวิเคราะห์สารชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มนี้ได้อาจจะพบข้อมูลที่ทำให้ทราบผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นขององค์ประกอบสารทุติยภูมิจากต้นหนอนตายหยากจากการได้รับยีน STS เพิ่มขึ้นและก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้สนใจที่จะใช้ต่อไปในเชิงการค้า

เอกสารอ้างอิงโครงการวิจัย

- กฤษณา ภูตคาม. 2525. รวบรวมรายงานการศึกษารากหนอนตายหยาก. เชียงใหม่: เกษตรสาร. 1(1): 28-34.
- กาญจนา รุ่งรักษานนท์ และอริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. (2551). การเพาะเลี้ยงหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae Craib*). อุบลราชธานี: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- กุลชาติ นาคจันทิก. (2554). การถ่ายยีนต้านทานสารวัชพืชไกลโฟเสทเข้าสู่มันสำปะหลังโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกศณี มณีภาส. (2546). การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยการใส่ **minibinary vector**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิตศ ดิษฐบรรจง, อรรถน์ วงศ์ศรี และอรุณี ใจเถิง. (2551). ศึกษาการเกิด **Somatic embryo** และการชักนำให้เกิดยอดอ่อน. กรุงเทพฯ: สำนักงานวิจัยและพัฒนาต้นพืชและเทคโนโลยีการเกษตร.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์. (2556). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสี้ยวดอกขาว. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- ธวัชชัย ศุภดิษฐ์, วิโรจน์ กิตติคุณ, รุ่งจรัส หุตะเจริญ, สันชัย จตุรสิทธา และ สุทธาพันธ์ โพธิ์กำเนิด. 2545. การใช้รากสมุนไพรรากหนอนตายหยากผสมในอาหารและมูลไก่เพื่อควบคุมหนอนแมลงวัน. II. พัฒนาการของหนอนแมลงวัน. เกษตร 30(2): 137-145
- นันทวัน บุญยประภัศร และ อรุณ ชัยชัยเจริญพร. 2543. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (4). คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 740 น.
- เพชรรัตน์ จันทรทิณ. (2556). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร. กรุงเทพฯ: คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี.
- พันธุ์ตรา กมล, อรุณยานี บุญย์ประมุข และอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2555). ผลของไซโตไคนิน และออกซิน ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงขมิ้นขาว. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 4, 87-92.
- รังษฤษดิ์ กาวิตะ. (2545). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมจิตร พงศ์พจน์ และสุภาพ ภูประเสริฐ. 2515. พืชกินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- สมจิตร พงษ์พจน์ และสุภาพ ภูประเสริฐ. 2534. พืชกินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 167 หน้า.

- สุมนา เหลืองจิตติกาญจนา. (2550). การถ่ายยีน *VPI* ของเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เข้าสู่
หนักรูที่ใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. (2547). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- อรดี สหวัชรินทร์. (2526). อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุษา พันธุ์ฤทธิ์ดำ. (2547). การเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโปยเซียน. วิทยานิพนธ์ วท.ม.,
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- Adams, M., Pacher, T., Greger, H. and Bauer, R. 2005. Inhibition of Leukotriene
biosynthesis by stilbenoids from *Stemona* species. *J. Nat. Prod.* 68: 83 – 85.
- Akanitapichat, P., Tongngok, P., Wangmaneerat, A. and Sripanidkulchai, B. 2005. Antiviral
and anticancer activities of *Stemona collinsae*. *Thai J. Pharm. Sci.* 29 (3-4):
125 - 126.
- Batra, S. and Kumar, S. (2003). *Agrobacterium*-mediated transient GUS gene expression in
buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). **Journal of Applied. Genetics**, 44, 449-458.
- Chakrabarty, R., Viswakarma, N., Bhat, S. R., Kirti, P. B., Singh, B. D. and Chopra, V. L.
(2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of
protocol and development of bt-transgenic cauliflower. **Journal Biosci**, 27, 495-502.
- Faridah, Q. F., Abdelmageed, A. H. A, Julia, A. A. and Nor H. R. (2011). Efficient *in vitro*
regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (avaluable medicinal plant) plantlets from
rhizome bud explants. **African Journal of Biotechnology**, 46, 9303-9308.
- Fernandes-Ferreira M, Novais, J. M and Pais, M. (1989). Calli and suspension cultures for
biomass production of *Euphorbia characias* L. subsp. *characias*. **Biotechnology
Letters**, 11, 259-264.
- Hain, R., Reif, H-J., Krause, E., Langebarteis, R., Kindl, H. Vornam, B. Wiese, W.,
Schmelzer, E., Schreier, PH., Stocker, RH and Stenzel, K. 1993. Disease resistance
results from foreign phytoalexin expression in novel plant. *Nature* 361: 153 – 156.
- Jiwajinda, S., N. Hirai, K. Watanabe, V. Santisopasri, N. Chuengsamarnyart, K. Koshimizu
and H. Ohigashi. 2001. Occurrence of the insecticidal 16, 17-didehydro-16(E)-
stemofoline in *Stemona collinsae*. *Phytochemistry* 56: 693-695.
- Kostecki, K., Engelmeier, D., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S. and Greger, H. 2004.
Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona* cf. *pierrei*.
Phytochemistry. 65: 99 – 106.

- Kodan, A., Kuroda, H. and Sakai, Fukumi. 2002. A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *PNAS*. Vol. 99(5): 3335 – 3339.
- Lin, L-G., Yang, X-Z., Tang, C-P., Ke, C-Q., Zhang, J-B and Ye, Y. 2008. Antibacterial stilbenoid from the roots of *Stemona tuberosa*. *Phytochemistry*. 69: 457 – 463.
- Leckband, G. and Lorz, H. 1998. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor Appl Genet*. 96: 1004 – 1012.
- Pacher, T., Seger, C., Engelmeier, D., Vajrodaya, S., Hofer, O. and Greger, H. 2002. Antifungal stilbenoid from *Stemona collinsae*. *J. Nat. Prod*. 65: 820 – 827.
- Park, Y. D., Ronis, D. H., Boe, A. A. and Cheng, Z. M. (1995). Plant Regeneration from Leaf Tissues of Four North Dakota Genotypes of Potato (*Solanum tuberosum* L.). **American Potato Journal**, 72(6), 329-338.
- Roupe, K. A., Remsberg, C. M., Yanez, J. A. and Davies, N. M. 2006. Pharmacometrics of stilbenes: Seguing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*. Vol. 1(1): 81 – 101.
- Salalamp, P. 1996. Medicinal plants in Thailand Volume 1. Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Amarin Printing and Publishing, Bangkok
- Szankowski, I., Briviba, K., Fleschhut, J. and Kiesecker, H. 2003. Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Rep*. 22: 141 – 149.
- Yong, W. T. L., Abdullah, J. O. and Mahmood, M. (2006). Optimization of *Agrobacterium* mediated transformation parameters for *Melastomata-ceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. **Scientia Horticulturae**, 109, 75-85.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

นิตยา สุขวรรณ และสุภาพร ภัตสร. (2559). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญของต้นหนอนตายหยาก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม 2559.