ว.วิทย. มข. 40(3) 867-876 (2555) KKU Sci. J. 40(3) 867-876 (2012)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นปทุมรัตน์ (*Curcuma* sp.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

In Vitro Culture and *Agrobacterium Tumefaciens* - Mediated Transformation of Precious Patumma (*Curcuma* sp.)

วารุต อยู่คง[1] *รัฐพร จันทร์เดช*[2] *และ ภพเก้า พุทธรักษ์*[1*]

บทคัดย่อ

ปทุมรัตน์ (*Curcuma* sp.) เป็นพืชที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจ แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นปทุมรัตน์ รายงานนี้จึงศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอ่อนของปทุมรัตน์บนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินชนิด TDZ ความเข้มข้น 0.0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างต้นอ่อนได้มากที่สุด 12 ต้นต่อต้นหลัก และศึกษาความเหมาะสมของ *Agrobacterium tumefaciens* และเวลาที่ใช้ในการปลูกถ่ายเชื้อ เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาการส่งถ่ายยีนของต้นปทุมรัตน์ต่อไป ในการศึกษาใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีพลาสมิด pBI121 ซึ่งมียีน *neomycin phosphotransferase* (*nptII*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก และยีน α-*glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ นำมาเขย่ารวมกับต้นอ่อนของปทุมรัตน์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มี kanamycin เป็นเวลา 2 เดือน จากการนำใบของต้นที่รอดชีวิตมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO และเขย่ารวมกับต้นอ่อนปทุมรัตน์ นาน 30 นาที พบชิ้นส่วนที่มีการแสดงออกของยีน *gus* 73.33 เปอร์เซ็นต์

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา 56000

[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

*Corresponding Author, E-mail: nu48330105@hotmail.com

ABSTRACT

Precious Patumma (*Curcuma* sp.) was a promising ornamental plant that could benefit from further development using modern biotechnology. In this study, *In vitro* retarded shoots culture of Precious Patumma was conducted on MS medium supplemented with cytokinin of TDZ at 0.0, 0.1 and 0.5 mg/l and IMA at 0, 2 and 4 mg/l . The results indicated that the highest number of retarded shoots (12 retarded shoots per explant) could obtain when cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ combination with 4 mg/l IMA and developed the *Agrobacterium*-mediated transformation protocol into Precious Patumma. The *A. tumefaciens* strain AGLO harboring the binary vector pBI121 containing the *neomycin phosphotransferase* gene (*nptII*) as a selectable marker and the *α-glucuronidase* (*gus*) gene as a reporter was cultured in MS medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ combination 4 mg/l IMA . The bacteria were diluted incubated with *in vitro* propagated Precious Patumma retarded shoots in MS medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ combination 4 mg/l IMA for 30 minutes. Treated retarded shoots were selected in MS medium containing 100 mg/l kanamycin for 6 weeks. GUS bioassay was used to observe *gus* gene expression in leaves of transgenic plants. The results revealed that the highest percentage of transformed Precious Patumma (73.33%) was obtained when *in vitro* Precious Patumma retarded shoots were inoculated with *A. tumefaciens* at 30 minutes.

คำสำคัญ: ปทุมรัตน์ *Agrobacterium tumefaciens* pBI121 ยีน *gus*

Keywords: Precious Patumma, *Agrobacterium tumefaciens*, pBI121, *gus* gene

บทนำ

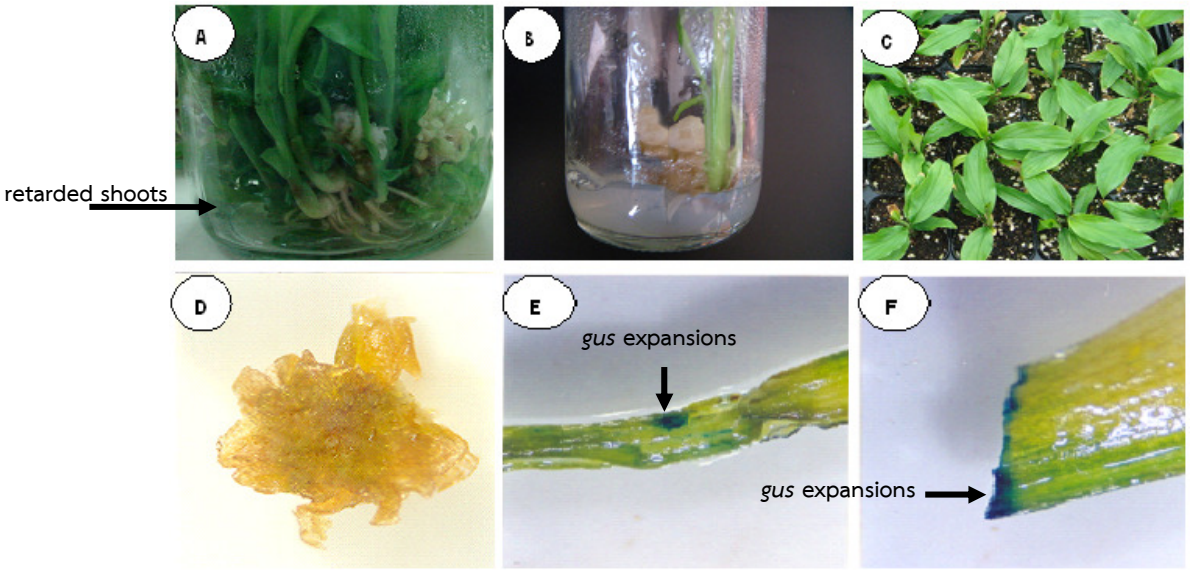
ปทุมรัตน์ (*Curcuma* sp.) มีชื่อสามัญว่า Precious Patumma ชื่อทางการค้า Khmer-Pearl Pink เป็นพืชที่มีช่อดอกสวยงาม สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นไม้ตัดดอก ไม้กระถาง (สุรวิช, 2540) ปทุมรัตน์เป็นไม้ดอกที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศกัมพูชา ปัจจุบันได้รับความนิยมในตลาดโลก (เยาวลักษณ์, 2544) ปทุมรัตน์อยู่ในกลุ่มของปทุมมา มีการส่งออกหัวพันธุ์ไปยังประเทศเนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น และแอฟริกา (อรัญญา, 2541) แต่ประเทศไทยไม่สามารถส่งออกได้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดโลก เนื่องจากปัญหาโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Psuedomonas solanacearum* ตลาดต่างประเทศจึงห้ามนำเข้าหัวพันธุ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้ตามจำนวนที่ต้องการ และการปลูกปทุมรัตน์อยู่ในช่วงต้นฤดูฝน ผลผลิตออกสู่ตลาดได้ระยะเดียว จึงทำให้การควบคุมระบบตลาดไม่อยู่ในทิศทางที่ดี (สุรวิช, 2539) การส่งออกในรูปดอกไม้สดยังมีน้อยมาก เนื่องจากเกษตรกรไม่สามารถเก็บดอกตลอดฤดูปลูกได้ (ประสบ, 2543)

ปทุมรัตน์เป็นไม้ดอกที่มีโอกาสขยายตลาดในต่างประเทศได้อีกมากรัฐบาลจึงมีการกำหนดนโยบายเพื่อพัฒนาทั้งด้านการผลิต และการตลาดไม้ดอกไม้ประดับตั้งแต่แผนพัฒนาฯ ฉบับที่ 7 โดยดำเนินการวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตของไม้ดอกไม้ประดับโดยเน้นการวิจัย และพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะแปลกใหม่ ให้ผลผลิตสูง คุณภาพดี อายุการใช้งานนาน ทนทานต่อการเข้าทำลายของโรค และแมลง และทนทานต่อการขนส่ง เพื่อจะเป็นการช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการผลิต และการตลาดของไม้ดอกไม้ประดับของไทย สำหรับการส่งออกก็ต้องเผชิญการแข่งขันที่รุนแรงมากขึ้น โดยประเทศคู่แข่งทั้งรายเก่าและรายใหม่เจาะขยายตลาดส่งออกเพื่อแย่งชิงส่วนแบ่งตลาดจากไทย ผู้ประกอบการของไทยต้องอาศัยการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต การคิดค้นพันธุ์ใหม่ๆ ทั้งในด้านสีสัน และรูปทรง รวมทั้งการเน้นการขยายประเภทการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับเมืองร้อนประเภทอื่น ๆ ทั้งนี้เพื่อให้มีความหลากหลาย เน้นการตอบสนองความต้องการของตลาดให้มากขึ้น เนื่องจากในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พันธุวิศวกรรม และชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้มีการพัฒนา และมีบทบาทกับการดัดแปลง หรือปรับปรุงพันธุ์พืช รวมทั้งเพิ่มผลผลิต และมูลค่าของพืชทำให้มีผลต่อการค้า และเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefacience* เป็นพาหะประสบความสำเร็จในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น *Eustoma grandiflorum* Raf. (Ledger et al., 1997) ข้าว ข้าวโพด และ ธัญพืช (Cheng et al., 2004) *Festuca arundinacea* Schreb.(Wang and Ge, 2005) *Aloe barbadensis* Mill. (He et al., 2007) และ *Festuca pratensis* Huds. (Gao et al., 2009) นอกจากนี้ Spelt et al. (2000) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *dfr* (dihydroflavonol-4-reductase) ในดอกพิทูเนียโดยใช้ *A. tumefaciens* พบการแสดงออกของยีน *dfr* และดอกของพิทูเนียเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจำนวนมากจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นอ่อนปทุมรัตน์ด้วยแบคทีเรีย *A. tumefacience*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ผลของ IMA (Imazalil) และ TDZ (Thidiazuron) ต่อการพัฒนาต้นอ่อนปทุมรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนปทุมรัตน์ (retarded shoots) ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดเชียงราย) (รูปที่ 1A) ลอกกาบหุ้มออก และตัดให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม IMA ความเข้มข้น 0, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความสว่างของแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) เพาะเลี้ยงต้นอ่อนปทุมรัตน์เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และจำนวนราก วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลจากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple test



รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นอ่อนปทุมรัตน์ (A): ตัวอย่างต้นของปทุมรัตน์ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดเชียงราย (B): ต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (C): ต้นปทุมรัตน์ที่รอดชีวิตหลังจากนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน (D): ต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (control) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค GUS histochemical assay เนื้อเยื่อไม่ติดสีน้ำเงิน (E และ F): ปทุมรัตน์ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค GUS histochemical assay เนื้อเยื่อติดสีน้ำเงิน

นำต้นปทุมรัตน์ที่มีรากจากการเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อมาปรับสภาพในอุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูกหลังจากนั้นนำมาย้ายปลูกในวัสดุปลูกในกระถางที่ประกอบด้วย ดินร่วน ทราย และขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำให้ชุ่ม เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์

แบคทีเรีย และพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

การส่งถ่ายยีนครั้งนี้ใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีพลาสมิด pBI121 (ที่มียีน *dfr* (dihydroflavonol-4-reductase) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ทั้งนี้พลาสมิด pBI121 จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี electroporation สำหรับโครงสร้างของเวคเตอร์ pBI121 มียีน *neomycin phosphotransferase* (*nptII*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS และยีน *α-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV 35S

ศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นอ่อนปทุมรัตน์โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

นำต้นอ่อนปทุมรัตน์ (retarded shoots) ที่ปลอดเชื้อ ขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อมาบ่มร่วมกับอาหารเหลวสูตร MS ที่

เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร, สารละลายเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีพลาสมิด pBI121 (เจือจางจากสารละลายเชื้อที่ OD_{600} = 0.65) โดยเขย่าร่วมกันเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นซับส่วนเกินของเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วนำต้นอ่อนปทุมรัตน์ไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* โดยล้างต้นอ่อนปทุมรัตน์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มี cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นจึงนำต้นอ่อนปทุมรัตน์ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารคัดเลือกที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค GUS histochemical assay

นำต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยใช้ส่วนของต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตรวจสอบโดยวิธี GUS histochemical assay โดยตัดต้นอ่อนมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Dglucuronide (X-Gluc) [50 mM NaHPO4, pH 7; 10 mM EDTA, pH 7; 0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 0.5 mM $K_4Fe(CN)_6$; 0.1% Triton X-100; 1 mM XGluc] เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการแสดงออกของยีน *gus* จะทำให้เกิดการทำปฏิกิริยากับ X-Gluc และเห็นเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นล้างชิ้นส่วนต้นอ่อนโดยแช่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดสีเขียวของคลอโรฟิลล์ออก ซึ่งจะทำให้เห็นสีน้ำเงินชัดเจนขึ้น

การตรวจสอบยีน *gus* โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

ยีน *gus* จะถูกตรวจสอบโดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยการใช้พลาสมิด pBI121 เป็น positive control และต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนเป็น negative control โดยตัวอย่างที่ใช้ทดสอบจะถูกนำไปเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้ไพรเมอร์ gusF (5' -CTG TAG AAA CCC CAA CCC GTG- 3') และ gusR (5' -CAT TAC GCT GCG ATG GAT CCC-3') ในแต่ละปฏิกิริยาใช้ DNA template (10 ng/µl) 1 µl, 10x PCR buffer 2 µl, 50 mM$MgCl_2$ 0.5 µl, 25 mM dNTP 0.16µl, Primer F (20 pmol/µl) 1 µl, Primer R (20 pmol/µl) 1 µl, Taq DNA polymerase 0.5 unit, steriled ddH_2O 15 µl ปริมาตรสุดท้าย 20 µl ปฏิกิริยา PCR เริ่มจากการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เพื่อให้เกิดการจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) จากนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ต่อด้วย 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) เมื่อปฏิกิริยาครบ 30 รอบแล้วจึงนำสารที่ได้มาแยกโดยวิธี gel electrophoresis บน agarose gel เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 0.5X บัฟเฟอร์ TBE และ นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพเก็บไว้

ผลการทดลอง

ผลของ IMA (Imazalil) และ TDZ (Thidiazuron) ต่อการพัฒนาต้นอ่อนปทุมรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาผลของ IMA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนของปทุมรัตน์ หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน พบว่าต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจำนวนต้นอ่อน 0.6 ต้นต่อต้นหลัก ขณะที่ผลของการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ต้นใหม่จำนวน 4.6 และ 9.2 ต้นต่อต้นหลักตามลำดับ ต้นที่ได้มีกาบใบขนาดเล็กและไม่มีการแผ่ของใบ ส่วนการใช้ IMA ร่วมกับ TDZ สามารถเพิ่มจำนวนต้นใหม่ได้มากที่สุด และมากกว่าใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว นั่นคือ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนเริ่มมีการสร้างต้นอ่อนเกิดขึ้น (รูปที่ 1B) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนให้ต้นใหม่จำนวน 12 ต้นต่อต้นหลัก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของ IMA และ TDZ ต่อการพัฒนาต้นอ่อนปทุมรัตน์ในสภาพปลอดเชื้อ

IMA (mg/l)	TDZ (mg/l)	Shoot number /explants	Shoot length /explants	Leaf number /explants	Root number /explants
0	0	0.60±0.24[a]	1.00±0.44[a]	1.00±0.44[a]	1.60±0.62[bcd]
2	0	0.40±0.24[a]	0.60±0.40[a]	1.00±0.63[a]	1.40±0.87[bcd]
4	0	2.20±0.20[b]	3.20±0.37[b]	2.20±0.20[b]	3.20±0.20[e]
0	0.1	4.60±0.24[c]	1.40±0.24[a]	1.40±0.24[ab]	1.60±0.24[bcd]
2	0.1	10.20±0.39[f]	1.40±0.24[a]	1.00±0.31[a]	2.00±0.31[cde]
4	0.1	8.20±0.37[d]	0.82±0.09[a]	1.40±0.24[ab]	2.60±0.24[de]
0	0.5	9.20±0.30[e]	1.40±0.24[a]	0.80±0.37[a]	0.80±0.37[abc]
2	0.5	11.20±0.37[g]	0.80±0.12[a]	0.60±0.24[a]	0.00±0.00[a]
4	0.5	12.00±0.31[g]	058±0.11[a]	0.60±0.24[a]	0.40±0.24[ab]

Values represent means ±SE means followed by the same letter within columns are not significantly different ($p \leq 0.05$) using Duncan's multiple test.

การนำต้นปทุมรัตน์ที่เกิดขึ้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความแข็งแรงและเกิดราก ปลูกในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินร่วน ทราย และขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 ในสภาพแวดล้อมภายนอก เมื่อย้ายปลูกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ต้นปทุมรัตน์เจริญเติบโตได้ดี โดยมีการเจริญของยอดใหม่เกิดขึ้น และอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1C)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค GUS histochemical assay

จากการนำต้นปทุมรัตน์ที่ทำการส่งถ่ายด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่ต้านทานต่อ kanamycin นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดย GUS bioassay พบว่าต้นอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีน และมีการแสดงออกของยีน *gus* มีสีน้ำเงินตามบริเวณเส้นใบ (รูปที่ 1E และ 1F)

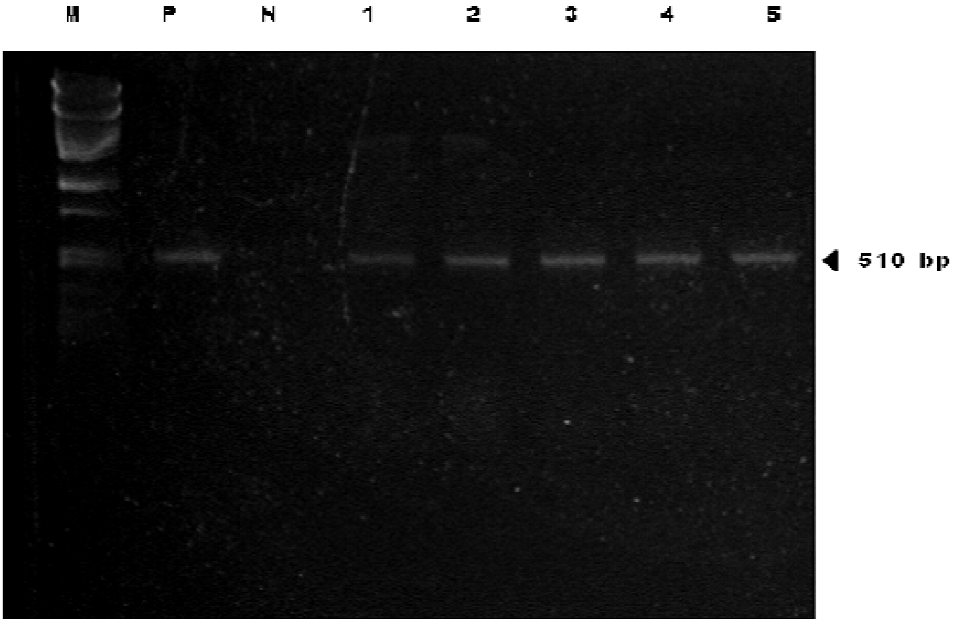
และต้นควบคุมจะกลายเป็นสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 1D) โดยต้นอ่อนที่เขย่าร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 30 นาที มี GUS activity 73.33 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบยีน *gus* โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

จากการนำต้นอ่อนที่มีการแสดงออกของยีน *gus* มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* โดยใช้พลาสมิด pBI121 เป็น positive control และต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนเป็น negative control โดยการทำ PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่ามีแถบที่ระบุขนาดของยีน *gus* ประมาณ 510 bp (รูปที่ 2)

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาผลของ IMA และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนปทุมรัตน์ หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน บนสูตรอาหาร MS พบว่า ต้นปทุมรัตน์ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีจำนวนต้นอ่อน 0.6 ต้นต่อต้นหลัก ขณะผลของการใช้ TDZ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ต้นใหม่จำนวน 4.6 และ 9.2 ต้นต่อต้นหลักตามลำดับ Lu (1993) รายงานว่า TDZ มีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดต้นพิเศษ (adventitious shoot) จำนวนมาก โดยอาหารที่เติม TDZ สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากกว่าอาหารที่เติมไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ (BA, kinetin และ zeatin) สูงถึง 42 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Werbrouck and Debergh (1996) รายงานผลของ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากปลายยอดของ *Spathiphyllum flouribundum* จำนวนมากถึง 50 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช การใช้ IMA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนต้นใหม่ได้เพียง 0.4 และ 2.2 ต้นต่อต้นหลักตามลำดับ แต่การใช้ IMA ร่วมกับ TDZ สามารถเพิ่มจำนวนต้นใหม่ได้มาก และมากกว่าใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว ผลของ IMA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ต้นใหม่จำนวน 10.20 และ 11.20 ต้นต่อต้นหลักตามลำดับ และ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ต้นใหม่จำนวน 8.20 และ 12.00 ต้นต่อต้นหลักตามลำดับ ซึ่ง IMA มีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพของ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนปทุมรัตน์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Werbrouck and Debergh (1996) ที่ใช้ IMA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวน 77 ต้น มากกว่า TDZ เพียงอย่างเดียวที่ให้จำนวน 50 ต้น ในการขยายพันธุ์ *S. flouribundum* บทบาทของ IMA ในการช่วยให้ TDZ ทำงานได้ดีขึ้นยังไม่มีการศึกษาระดับสรีรวิทยา แต่ Werbrouck and Debergh (1996) สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นการทำให้ระดับฮอร์โมนพืชหลายชนิดภายในต้นเปลี่ยนแปลงไปในระดับที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้น



รูปที่ 2 การตรวจสอบยีน *gus* โดยวิธี PCR โดยใช้ primer จำเพาะต่อยีน *gus* M: DNA marker, P: positive control, N: negative control, 1-5: transgenic plant (ลูกศรชี้แถบที่ปรากฏเป็นตำแหน่งของยีน *gus* ขนาดประมาณ 510 bp)

การส่งถ่ายยีนด้วยแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO พบว่า สามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นอ่อนปทุมรัตน์ โดยการบ่มในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีพลาสมิด pBI121 โดยมียีน *dfr* เป็นเวลา 30 นาที ต้นอ่อนปทุมรัตน์ที่มีการแสดงออกของยีน *gus* มีมากถึง 73.33 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยืนยันการมีอยู่ของยีนได้โดยการใช้ปฏิกิริยา PCR ซึ่งการศึกษานี้สามารถทดสอบ และยืนยันการแสดงออกของยีน *gus* ได้ จากการศึกษาของ Buddharak (2010) รายงายการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ช่อดอกย่อย (coinflorescense) ของปทุมมาโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค GUS histochemical assay พบว่าเนื้อเยื่อช่อดอกย่อยของปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pSCV1.6 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) มีการแสดงออกของยีน *gus* 65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pBI121 เมื่อตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินมีการแสดงออกของยีน *gus* 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ นี้มีการใช้ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ใบแอปเปิ้ล (*Malus zumi* Matsum.) โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่ระดับเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 1:10 และเขย่าร่วมกับใบนาน 10 นาที ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารเป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียส่งผลต่อการกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อ ซึ่งแม้ว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียนาน 4 วัน ให้ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุดคือ 22 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้เวลาเลี้ยง

เนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียนาน 2 วัน ทำให้สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อได้ดีกว่า (Xu et al., 2009) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Petri (2004) รายงานถึงการใช้สารละลายเชื้อ *A. tumefaciens* บ่มกับใบของอัลมอนด์ พบว่าการบ่มเป็นเวลานานกว่า 30 นาที ไม่มีผลเพิ่มความสามารถในการส่งถ่ายยีน แต่เพิ่มปัญหาในการกำจัดแบคทีเรียภายหลังการส่งถ่ายยีน ดังนั้นในการศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียทั้งระยะเวลาในการเขย่ารวมกับเชื้อแบคทีเรีย และระยะเวลาในการเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงก่อนนำมากำจัดเชื้อแบคทีเรียจึงมีความสำคัญ

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมรัตน์โดยใช้สิ้นส่วนต้นอ่อน (retarded shoots) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะที่สุดในการชักนำให้เกิดต้นใหม่จำนวนมาก คือสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IMA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO (pBI121) มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นอ่อนปทุมรัตน์โดยมีแสดงการออกของยีน *gus* ถึง 73.33 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

ประสบ บุตรพลอย. (2543). การผลิตและการตลาดปทุมมาเพื่อการส่งออกในภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 64 หน้า.

เยาวลักษณ์ แลงทั่น. (2544). ปทุมมานอกฤดูและการเก็บรักษาหัวพันธุ์. กสิกร 74(5): 78-68.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. (2539). ผลของคุณภาพและการเก็บเกี่ยวหัวพันธุ์ต่อการผลิตปทุมมา. รายงานการประชุมวิชาไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 2: 66-77.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. (2540). ปทุมมาและกระเจียว (*Curcuma*) ไม้ดอกไม้ประดับ. บริษัทอมรินทร์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ. 83 หน้า.

อรัญญา คัมภิรานนท์. (2541). ปทุมมาทิวลิปแห่งสยาม. วารสาร ธ.ก.ส. 21(2): 41-51.

Buddharak, P. (2010). Genetically modified plant with *Agrobacterium tumefaciens*: a tool for plant transformation. KKU Sci. J. 39(1): 14-27.

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

He, C., Zhang, J., Chen, J., Ye, X., Du, L., Zhao, H. and Dong, Y. (2007). Genetic transformation of *Aloe barbadensis* miller by *Agrobacterium tumefaciens*. Post. Biol. Tec. 34: L 1053-1060.

Ledger, S., Deroles, S. C. and Manson, D. G. (1997). Transformation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Plant Cell Rep. 16: 853-858.

Lu, C. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 29: 92-96.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Petri, C. (2004). Factors affecting gene transfer efficiency to apricot leaves during early *Agrobacterium* mediated transformation step. J. Hort. Sci & Biotech. 79(5): 704-12.

Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N. M. and Koes, R. (2000). *Anthocyanin l* of petunia encodes a

basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. Plant Cell 12: 1619-1631.

Wang, Z. Y. and Ge, Y. (2005). *Agrobacterium*-mediated high efficiency transformation of tall fascus (*Festuca arundinacea*). Plant Physiol 162: 103-113.

Werbrouck, S.P.O. and Debergh, P.C. (1996). Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin induced adventitious shoot proliferation in Araceae. J. Plant Growth Regul. 15: 81-85.

Xu, J., Wang, Y.Z., Yin, Y.H.X. and Liu, X.J. (2009). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd using leaf explant regeneration system. Electronic Journal of Biotechnology 12: 1–8.

Gao, C., Liu, J. and Nielsen. K. K. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation of meadow fascue (*Festuca pratensis* Huds.). Plant Cell Rep. 28: 1431-1437.

❑❑❑❑❑