ว.วิทย. มข. 41(1) 144-148 (2556) KKU Sci. J. 41(1) 144-148 (2013)

การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเข้ากล้วยไม้

Development of *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Orchid

ภพเก้า พุทธรักษ์[1] *วารุต อยู่คง*[2] *และ รัฐพร จันทร์เด*[3*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่โพรโทคอร์มกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO (pBI121 หรือ pSCV1.6) สำหรับยีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *dihydroflavonol 4- reductase gene* (*DFR*) โดยใช้พลาสมิด pBI121 หรือ pSCV1.6 ที่มี *gus* gene และ *kanamycin resistance* gene เป็นยีนรายงานผลตามลำดับ จากการตรวจสอบการแสดงออกของ *gus* gene พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายติดสีน้ำเงิน ในขณะที่พบการแสดงออกในระดับการ transcription ซึ่งตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค RT-PCR

ABSTRACT

The objective of this research was to establish gene transformation procedure for genus *Dendrobium* by using *Agrobacterium tumefaciens* AGLO (pBI121 or pSCV1.6). The *dihydroflavonol 4- reductase* gene (DFR) were constructed in plasmid pBI121 or pSCV1.6 which containing *gus* gene and *kanamycin resistance* gene as reporter gene. The positive results of GUS assay revealed the GUS activity blue while the expression level of transcription in the technical was inspected by RT-PCR

คำสำคัญ: *Dendrobium* sp., dihydroflavonol 4- reductase gene (DFR)

Keywords: *Dendrobium* sp., dihydroflavonol 4- reductase gene (DFR)

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

*Corresponding Auther, E-mail: auanmolec@hotmail.com

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในวงศ์ Orchidaceae ชื่อสามัญ Orchid ชื่ออื่น ๆ เอื้อง (ภาคเหนือ) เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอกและสีสันลวดลายสวยงามเป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย เพราะเป็นไม้ส่งออกขายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท มีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้ายไม้ เลี้ยงต้นกล้ายไม้จนกระทั่งให้ดอก ตัดดอก บรรจุ (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2543)

กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช ที่ศักยภาพด้านการตลาด เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี จากข้อมูลการส่งออกกล้วยไม้ที่มีใบรับรองปลอดศัตรูพืชของงานมาตรฐานและบริการตรวจพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ในปี 2543 มีมูลค่า 1,765 ล้านบาท และในปี 2544 มีมูลค่าสูงขึ้นเป็น 1,806 ล้านบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี และอเมริกา อย่างไรก็ตามปัญหาการแข่งขันการส่งออกในตลาดโลกที่สูงมาก ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องผลิตกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีลักษณะสีดอกที่สวยงามและแตกต่างไปจากเดิม (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เอกสารเศรษฐกิจการเกษตร, 2546) ดังนั้นหากสามารถปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีสีดอกแตกต่างไปจากธรรมชาติเดิมที่มีอยู่ ก็จะเป็นวิธีหรือทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าสินค้าและสามารถขยายตลาดการส่งออกให้ครอบคลุมความต้องการที่หลากหลายของกลุ่มลูกค้าได้มากขึ้น ส่งผลให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต ส่งออกและนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากตามไปด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมพืชทดลอง กล้วยไม้สกุล *Dendrobium*

ฟอกฆ่าเชื้อฝักกล้วยไม้ (*Dendrobium* sp.) โดยนำมาเผาไฟและแช่แอลกอฮอล์ 95% นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่คลอรอกซ์ความเข้มข้น 10% Tween20 1-2 หยด เขย่านาน 20 นาที (ทิวา, 2551) จากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับเอาน้ำออกด้วยกระดาษกรอง นำเมล็ดที่อยู่ในฝักไปวางบนอาหารสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นเล็กๆหรือต้นที่มีลักษณะเป็นโพรโตคอร์ม ให้แสง fluorescent (day light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-26 องศาเซลเซียส เลือกต้นที่สมบูรณ์ ตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 ตารางเซนติเมตร เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน โดยจำนวนตัวอย่างที่ใช้ส่งถ่ายยีนไม่น้อยกว่า 200 ชิ้น (explants)

พลาสมิดและยีนที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิดเพื่อการโคลนยีนได้แก่ pUC 18 และ 19, pGEM-T easy ส่วนพลาสมิดเพื่อการส่งถ่ายยีนได้แก่ pBI121 หรือ pSCV1.6 โดยที่พลาสมิด pBI121 มี ยีนที่ใช้ในการติดตามคือ Gus gene และ pSCV1.6 มียีนที่ใช้ในการติดตาม คือ *kanamycin resistance* gene โดยที่ยีนทั้งหมดอยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S promoter แบคทีเรียที่ใช้ในการโคลนยีน ได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 alpha และ JM109 ยีนที่ใช้ในการทดลองคือ ยีน *F3'H* หรือ *DFR* ในกล้วยไม้สกุลแอสโคเซนดา ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

การส่งถ่ายโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

นำชิ้นส่วนของกล้วยไม้มาแช่ในสารละลายแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO นาน 30 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อ (Manickavasagum et al., 2004) แล้วนำมาเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยอาหาร MS-20 ที่วางบนอาหารสูตร MS - TB เป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด เรียกวิธีการนี้ว่า co-cultivation เพื่อให้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช นำชิ้นส่วนของกล้วยไม้มาล้างเพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-5 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มี 400 mg/l ซีโฟทาซิม เป็นเวลา 30 นาที และเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ในสูตรอาหารดัดแปลง MS–CM ที่มีสารปฏิชีวนะ400 mg/l ซีโฟทาซิม และ 50 mg/l Kanamycin ย้ายเนื้อเยื่อทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากพืชพัฒนาเป็นต้น จึงนำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS Histochemical assay และเทคนิค Polymerase chain Reaction (PCR) สำหรับ *gus* gene และ 35S promoter ต่อไป

ผลการทดลองและอภิปราย

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการส่งถ่ายยีน

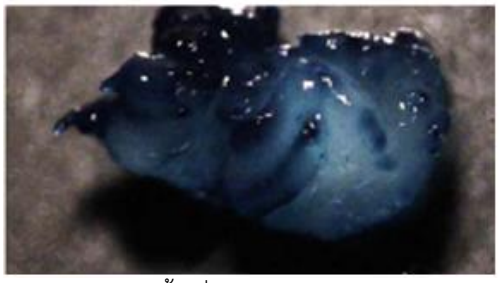
จากการชักนำและเพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มและต้นอ่อนของ *Dendrobium* บนอาหารแข็งสูตร VW2 ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน พบว่าเนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ดังรูปที่ 1 และพร้อมที่จะใช้ในการส่งถ่ายยีน อัตราการเจริญเติบโตของพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการถ่ายยีนในช่วงการคัดเลือก ซึ่งได้กล่าวโดย McCabe and Chirstou (1993)

การส่งถ่ายพลาสมิด โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

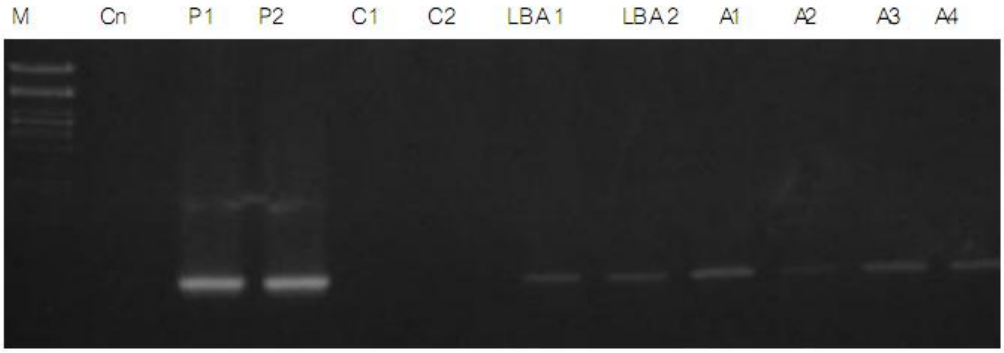
ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pDFR โดยการบ่มร่วมโพรโตคอร์มอายุ 2 เดือนร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายลงบนอาหารที่มี ซีโฟทาซิม 200 mg/L และไฮโกรมัยซิน 40 mg/L เป็นเวลา 60 วัน พบว่าโพรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดเท่ากับ 0.16% และเมื่อนำโพรโตคอร์มดัง กล่าวมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี Gus assay โพรโตคอร์มดังกล่าวมีการแสดงออกของยีน *gus* โดยจะมีสีฟ้าเกิดขึ้นดังรูปที่ 2 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ภพเก้า (2554) ศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ช่อดอกย่อยของปทุมมา โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* บนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของปทุมมา มีลักษณะเป็นสีน้ำเงินคิดเป็นร้อยละ 40

จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับการ Transcription ของยีน *gus* ด้วยเทคนิค RT-PCR และทำการวิเคราะห์ด้วย Agarose Gel Electrophoresis เปรียบเทียบกับ Positive control (รูปที่3)

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของโพรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW2 ที่มีสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม



รูปที่ 2 ลักษณะการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อโพรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *DFR* ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* Transformation โดยผ่านการคัดเลือกในอาหารสูตร VW2 ที่มีไฮโกรมัยซิน 40 mg/L เป็นเวลา 45 วัน



รูปที่ 3 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในพืช Transgenic ด้วยเทคนิค RT-PCR (M = molecular marker; Cn=non-template; C1, C2=non-transform; P1, P2 = positive control vectors; LBA1, LBA2 = positive control; A1, A2, A3, A4 = *DFR* transformed *Dendrobium*)

สรุป

จากการศึกษาการส่งถ่ายยีน DFR เข้าสู่กล้วยไม้สกุล *Dendrobium* โดยเลือกใช้เนื้อเยื่อชนิดโพโตรคอร์ม โดยทำการส่งถ่ายด้วยเทคนิค *Agrobacterium* Transformation พบว่าประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อดังกล่าว โดยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายติดสีน้ำเงิน ในขณะที่พบการแสดงออกในระดับการ Transcription ซึ่งทำการตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งจากผลการวิจัยนี้จะใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลอื่นได้

เอกสารอ้างอิง

ทิวา รักนิ่ม อมรพันธ์ แก้วศรีนวล ปรีชา วิทยพันธุ์ และจีรศักดิ์ แสงศรี. (2551). ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้พื้นเมืองสิงโตอาจารย์เต็มในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 39(3): 258-261.

ภพเก้า พุทธรักษ์. (2554). พืชดัดแปลงพันธุกรรมกับการถ่ายฝากสารพันธุกรรมด้วย *Agrobacterium tumefaciens*. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 39(1): 14-27.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เอกสารเศรษฐกิจการเกษตร. (2546). การผลิตและการตลาดกล้วยไม้.สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. (2543). กล้วยไม้ไทย. โรงพิมพ์ โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. หน้า 15.

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

McCabe, D. and Christou, P. (1993). Direct DNA transfer using electric discharg particle acceleration (ACCELL™ Technology). Plant Cell Tissue Organ Culture 33: 227-236.

❑❑❑❑❑