ว.วิทย. มข. 44(4) 770-782 (2559) KKU Sci. J. 44(4) 770-782 (2016)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ใบอ่อนของแวววิเชียร

Tissue Culture and *gus* Gene Transformation into Young Leaf of *Angelonia goyazensis* Benth.

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

[1]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

[2]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา 56000

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

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่แวววิเชียร การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแวววิเชียรในสภาพปลอดเชื้อบนสูตร อาหาร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เกิดยอดมากที่สุด 38.21 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช บนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ยอดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญของรากทุกยอดและมีค่าเฉลี่ยจำนวนรากมากที่สุด 5.3 รากต่อยอด ส่วนการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนแวววิเชียร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดของ cefotaxime ในอาหารที่ใบอ่อนแวววิเชียรสามารถเจริญและสร้างยอดได้ ไม่แตกต่างจากการทดลองชุดควบคุม ขณะที่ kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของใบอ่อนแวววิเชียร การทดลองการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ใบอ่อนแวววิเชียร โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pSTART) พบว่าการเขย่าใบอ่อนแวววิเชียรร่วมกับ *Agrobacterium* นาน 20 นาที ให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงที่สุด คือ 32.30 เปอร์เซ็นต์ และสามารถตรวจสอบยืนยันการแสดงออกของยีน *gus* ได้ โดยวิธี gus assay

ABSTRACT

The objective of this research was to study tissue culture and *gus* gene transformation into *A. goyazensis*. *In vitro* culture of young leaf of *A. goyazensis* using MS medium supplemented with 0-0.5 mg/L of TDZ and IAA was studied. Highest shoots regeneration, 38.21 shoots per explants was found on MS medium supplemented with 0.3 mg/L TDZ and 0.1 mg/L

IAA. The MS medium supplemented with 0.1 mg/L IAA induced rooting of all shoots with the highest average number of 5.3 roots per shoot. A study on the effect of antibiotics on growth of young leaf of *A. goyazensis* was conducted for 6 weeks. The highest concentration of cefotaxime in the medium that *A. goyazensis* young leaf can grow and regenerate shoots without significant difference from the control was 250 mg/L, while 25 mg/L kanamycin was sufficient for inhibition of young leaf growth. The *gus* gene transformation into young leaf of *A. goyazensis* by using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (pSTART) for 20 minutes resulted in the highest transformation efficiency of 32.30 percent and *gus* gene expression was confirmed by gus assay.

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Agrobacterium* แววิเชียร การส่งถ่ายยีน gus assay

Keywords: Tissue culture, *Agrobacterium, Angelonia goyazensis*, Genetic transformation gus assay

บทนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการส่งออกทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยเป็นอย่างมาก จึงทำให้อุตสาหกรรมการผลิต และส่งออกไม้ดอกไม้ประดับได้เข้ามามีบทบาทที่สำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก และไม่เพียงแต่ประเทศไทยเท่านั้นในตลาดต่างประเทศต่างมีความต้องการไม้ดอกไม้ประดับในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ระบบการแข่งขันในการผลิตเพื่อส่งออกไม้ดอกไม้ประดับสูงขึ้นตามไปด้วย และเพื่อขยายโอกาสทางการตลาดจึงต้องมีการสร้างความหลากหลายของสีสันดอกไม้เพื่อสร้างจุดสนใจ และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แววิเชียร มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Angelonia goyazensis* Benth. อยู่ในวงศ์ Plantainaceae (เต็ม, 2557) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ เม็กซิโก และบราซิล เป็นไม้ดอกล้มลุก สูงประมาณ 64 เซนติเมตร ใบเรียวยาว ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกตามลำต้นไล่กันไปเกือบตลอดต้น มีชื่อสามัญว่า Little Turtle มีสีม่วงแก่ ม่วงอ่อน และสีขาว ต่อมาภายหลังจึงมีสีม่วงสลับขาว และสีชมพู แต่สีชมพูอายุสั้น แววิเชียรขยายพันธุ์ด้วยการปักชำ แต่ยังขาดดอกสีแดง และสีเหลือง และยังมีแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายโดยเฉพาะเพลี้ย (Plaschil and Olbricht, 2008) ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีความหลากหลายของสีดอกแววิเชียร และสร้างพืชให้มีความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช การปรับปรุงพันธุ์โดยการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้ประสบความสำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด ทั้งในแง่ของการสร้างพันธุ์ที่มีลักษณะแปลกใหม่ และต้านทานโรค แต่อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนของการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แววิเชียรนั้น ยังต้องการงานพื้นฐานสำหรับที่จะนำมาใช้ในการส่งถ่ายยีน เช่น ชิ้นส่วน หรือเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แววิเชียร วิธีการถ่ายส่งยีนตลอดจนระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดต้นหลังการส่งถ่ายยีน ในปัจจุบันการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว (Cheng et al., 2004), แววมยุรา (Suzuki et al., 2000; Ueyama et al., 2002; Fukusaki et al., 2004; Ono et al., 2006; Seitz et al., 2007), พิทูเนีย (Mizutani et al., 2003; Tsuda et al., 2004),

เบญจมาศ กุหลาบ และคาร์เนชัน (Brugliera et al., 2000; Chandler and Tanaka, 2007; Katsumoto et al., 2007; Tanaka and Ohmiya, 2008) แต่ยังไม่พบการศึกษาการส่งถ่ายยีนในแววิเชียรวัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ใบอ่อนแววิเชียร

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนแววิเชียร

นำใบอ่อนแววิเชียรในสภาพธรรมชาติ มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที และเทแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เติม tween-20 จำนวน 1-2 หยด เขย่านาน 10 นาที แล้วล้าง 3 ครั้งๆ ละ 3 - 5 นาที ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดแต่งชิ้นส่วนใบที่ถูกสารเคมีทำลาย (สังเกตจากสีจะซีดกว่าปกติ) ตัดแต่ละชิ้นให้มีขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร นำไปวางบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ๆ ละ 3 ตัวอย่าง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) บันทึกจำนวนใบอ่อนที่เกิดยอด นำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 20

การศึกษาการชักนำให้เกิดรากจากยอดแววิเชียร

นำยอดที่มีความยาวเฉลี่ย 1-2 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ๆ ละ 3 ตัวอย่าง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ บันทึกจำนวนยอดที่มีรากเกิดขึ้น และจำนวนรากที่เกิดขึ้นของแต่ละยอด นำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 20

การศึกษาความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ kanamycin เพื่อใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

การศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของ kanamycin ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรที่ทำให้เนื้อเยื่อใบอ่อนตาย โดยนำใบอ่อนแววิเชียร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kanamycin ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัวอย่าง แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของใบอ่อน จำนวนยอดที่เกิดขึ้นบนใบอ่อนแต่ละชิ้น นำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple

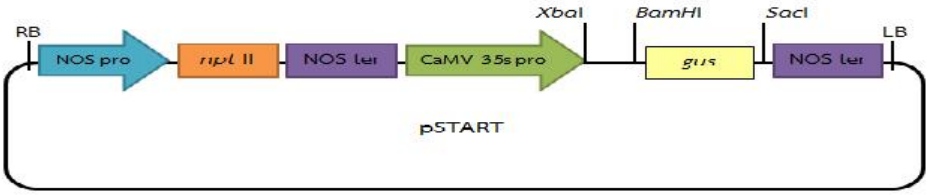
range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 20

การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนแววิเชียร

การทดสอบหาความเข้มข้นสูงที่สุดของ cefotaxime ในอาหารคัดเลือกที่ใช้กำจัด*Agrobacterium* ภายหลังการส่งถ่ายยีนแต่ให้มีผลกระทบต่อการเจริญและสร้างยอดของเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรน้อยที่สุด โดยนำใบอ่อนแววิเชียรมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัวอย่าง แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ บันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนใบอ่อนแววิเชียรแต่ละชิ้น แล้วนำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 20

การศึกษาการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ใบอ่อนแววิเชียร โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

นำใบอ่อนแววิเชียร ตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร นำมาเขย่าร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pSTART ประกอบด้วยยีน *npt* II ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล (รูปที่ 1) เป็นเวลา 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงร่วมกันในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ทำการกำจัด *Agrobacterium* ย้ายเนื้อเยื่อเขย่าในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนสูตรอาหารคัดเลือก MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกจำนวนใบอ่อนที่รอดชีวิตและจำนวนใบอ่อนที่เกิดจุดสีฟ้าเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี gus assay แล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน



รูปที่ 1 โครงสร้างของ pSTART ประกอบด้วย RB, right border; LB, left border; NOS pro, nopaline synthase gene promoter; NOS ter, nopaline synthase gene terminator; CaMV 35S, 35S promoter from cauliflower mosaic virus; *npt* II, neomycin phosphotransferase gene; *gus*, beta-glucuronidase gene

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี gus assay (Jefferson et al., 1987)

สุ่มชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก จำนวน 100 ตัวอย่าง และใบอ่อนที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนมาแช่ในสารละลาย X-Gluc (5-bomo-4-chloro-3-indolyl gucuronide) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกิดสารสีฟ้าบนเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียร

ผลการวิจัย

การศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนแววิเชียร

จากการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนแววิเชียร เมื่อเพาะเลี้ยงใบอ่อนแววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนแววิเชียรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (รูปที่ 2 ก) ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนเฉลี่ย 15.23, 22.25, 20.83 และ 10.82 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนแววิเชียรคือสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามรถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดจำนวนเฉลี่ย 38.21 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 1, รูปที่ 2 ข)

ตารางที่ 1 การชักนำให้เกิดยอดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบแววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างกัน

TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดต่อชิ้นใบอ่อน (ค่าเฉลี่ย ±S.E)*
0.0	0.0	0	0.00±0.00[d]
0.1	0.1	90	15.23±0.13[c]
0.2	0.1	95	22.25±0.23[b]
0.3	0.1	100	38.21±0.25[a]
0.4	0.1	95	20.83±0.16[b]
0.5	0.1	70	10.82±0.19[c]

*ค่าเฉลี่ย ±S.E ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการชักนำให้เกิดรากจากยอดแววิเชียร

ผลของการชักนำให้เกิดรากจากยอดแววิเชียร โดยนำยอดที่มีความยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตรที่ทวีจำนวนขึ้นจากการเลี้ยงแผ่นใบบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร

MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.1, 3.2, 2.8 และ 1.1 รากต่อยอด ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหารที่สามารถชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้จำนวนเฉลี่ย 5.3 รากต่อยอด (ตารางที่ 2 รูปที่ 2 ค)

ตารางที่ 2 ผลของ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการชักนำยอดแวววิเชียรให้เกิดรากจากยอดแวววิเชียร

IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดที่เกิดราก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนรากต่อยอด (ค่าเฉลี่ย ±S.E)*
0.0	0	0.0±0.00[d]
0.1	100	5.3±0.18[a]
0.2	100	3.1±0.13[b]
0.3	100	3.2±0.15[b]
0.4	90	2.8±0.06[b]
0.5	90	1.1±0.09[c]

*ค่าเฉลี่ย ±S.E ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของแวววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (ก) สูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้ใบอ่อนสามารถสร้างยอดได้ดีที่สุด (ข) และสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ดีที่สุด (ค)

การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin เพื่อใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการส่งถ่ายยีนที่มียีน neomycin phosphotransferase (*npt* II) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่มีการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแวววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kanamycin ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100 และ 150 มิลลิกรัม

ต่อลิตร และทำการย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนแวววิเชียรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ตั้งแต่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป ไม่มีการสร้างยอดใหม่เกิดขึ้น และเนื้อเยื่อใบอ่อนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตาย ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มต่ำสุดของสารปฏิชีวนะ kanamycin ใช้เป็นสารคัดเลือกในการส่งถ่ายยีน คือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3 รูปที่ 3 ก, ข)

ตารางที่ 3 ผลของ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญและสร้างยอดของเนื้อเยื้อใบแวววิเชียร

kanamycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ค่าเฉลี่ย ±S.E)*	ลักษณะใบ
0	38.1±0.14[a]	สีเขียว
25	00.0±0.00[b]	สีน้ำตาล
50	00.0±0.00[b]	สีน้ำตาล
75	00.0±0.00[b]	สีน้ำตาล
100	00.0±0.00[b]	สีน้ำตาล
150	00.0±0.00[b]	สีน้ำตาล

*ค่าเฉลี่ย ±S.E ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนแวววิเชียร

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับการกำจัด *Agrobacterium* ภายหลังการส่งถ่ายยีน เพื่อทดสอบความต้านทานของใบอ่อนแวววิเชียรต่อสารปฏิชีวนะ cefotaxime โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแวววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ กล่าวคือ อาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime มีผลต่อการสร้างยอดใหม่ของแวววิเชียร พบว่าอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีจำนวนยอดเฉลี่ย 35.4, 35.1, 34.2, 34.0 และ 23.7 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นสูงสุดของ cefotaxime ที่ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ใช้สำหรับการกำจัด *Agrobacterium* (ตารางที่ 4 รูปที่ 3 ค)

ตารางที่ 4 ผลของ cefotaxime ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างยอดของเนื้อเยื่อแผ่นใบแววิเชียร

Cefotaxime (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ค่าเฉลี่ย ±S.E)*
0	36.1±0.19[a]
100	35.4±0.24[a]
150	35.1±0.24[a]
200	34.2±0.21[a]
250	34.0±0.21[a]
300	23.7±0.12[b]

*ค่าเฉลี่ย ±S.E ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 3 การเจริญของเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุม (ก) เนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) และ เนื้อเยื่อใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค)

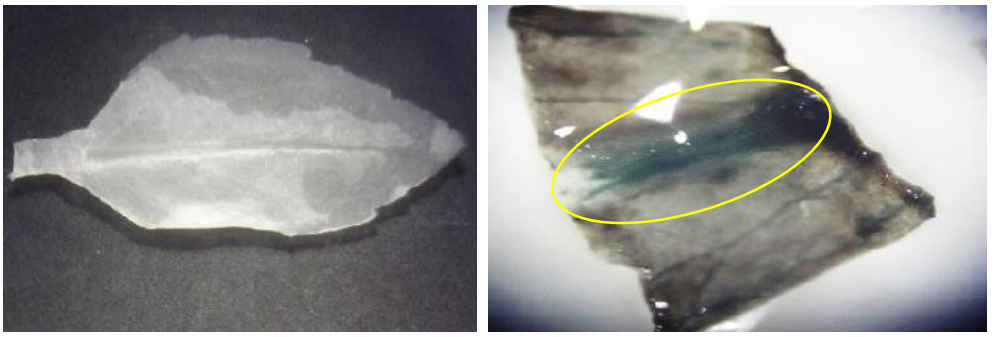
การศึกษาการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ใบอ่อนแววิเชียร โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี gus assay

การทดสอบการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART ซึ่งมียีน *npt* II เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่เนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียร โดยมีระยะเวลาในการเขย่าเนื้อเยื่อใบอ่อนร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลา 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที พบว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียร ที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อใบอ่อนของแววิเชียรที่เขย่าร่วมกับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 20 นาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกสูงที่สุด 65 เปอร์เซ็นต์ และมีการเจริญของยอดใหม่เกิดขึ้น ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน พบว่าสูงที่สุด คือ 32.03 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี gus assay หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนของแววิเชียรที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART ที่เขย่าร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย

เป็นเวลา 20 นาที มีการแสดงออกของยีน gus เนื่องจากเกิดสีฟ้าจากการย่อยสาร X-Gluc ด้วยเอนไซม์ beta-glucuronidase บนเนื้อเยื่อ ส่วนเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิดไม่มีการเกิดสีฟ้า (รูปที่ 4 ก ข)

ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาในการเขย่าร่วมกันของเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรและเชื้อ *Agrobacterium* เมื่อนำแผ่นใบไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ระยะเวลา (นาที)	จำนวนใบอ่อนที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน	จำนวนใบอ่อนที่การรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ก)	จำนวนใบอ่อนที่เกิดจุดสีฟ้า (ข)	ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน ข/ก (เปอร์เซ็นต์)
0	100	0	0	0
10	100	48	1	2.08
15	100	50	9	18.00
20	100	65	21	32.30
25	100	45	11	24.44
30	100	30	5	16.66



(ก) (ข)

รูปที่ 4 เนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* (ก) และเนื้อเยื่อใบอ่อนที่ได้รับการส่งถ่ายยีนตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* มีสีฟ้าเกิดบนเนื้อเยื่อ (ข)

วิจารณ์ผลการวิจัย

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนแววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ TDZ ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้จำนวนยอดของแววิเชียรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ทุกแผ่นใบเกิดยอดและมีจำนวนเฉลี่ย 38.21 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 1) เนื่องจาก TDZ จะส่งผลกระตุ้นให้มีการสร้างยอดแขนงได้มากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เช่น BA และ Kinetin แต่ขณะเดียวกัน TDZ มีผลทำให้ความยาวยอดลดลงด้วย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก TDZ เป็นไซโทไคนินที่มีฤทธิ์แรงกว่า BA และ Kinetin ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง

ของเนื้อเยื่อไปเป็นอวัยวะ (cell differentiation) คือ ยอดแขนงได้มากกว่า BA และ Kinetin (Murthy et al., 1998) TDZ มีคุณสมบัติเป็นไซโทไคนินที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าไซโทไคนินชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในพืชที่มีเนื้อไม้ นอกจากนี้การใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำๆ (น้อยกว่า 1 ไมโครโมลาร์) มีแนวโน้มกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชเกิดยอดจำนวนมากกว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้นสูง (Huetteman and Preece, 1993)

จากผลการทดลองเพื่อชักนำให้ยอดของแวววิเชียรเกิดรากในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ยอดที่เกิดราก และจำนวนรากต่อยอดของแวววิเชียร ที่เกิดขึ้นบนสูตรอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มออกซิน พบว่า ยอดของแวววิเชียรสามารถสร้างรากขึ้นมาใหม่ตรงบริเวณโคนชิ้นส่วนได้ดีที่สุดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่าสูตรอาหารที่เติม IAA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kongbangkerd et al. (2005) และ Martin (2001) ที่รายงานว่า IAA สามารถการชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า NAA ในขณะที่อาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชจะมีผลชักนำให้การสร้างรากเกิดขึ้นได้ค่อนข้างต่ำหรือไม่สามารถสร้างรากได้เลย (Wawrosch et al., 2002)

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้เป็นสารคัดเลือกผลการถ่ายส่งยีนเข้าสู่ใบอ่อนแวววิเชียร โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแวววิเชียรบนสูตรอาหาร MS ที่เติม kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ และเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะ kanamycin ใช้เป็นสารคัดเลือกในการส่งถ่ายยีน คือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ทำให้เนื้อเยื่อใบอ่อนตาย เพื่อใช้คัดแยกเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ตารางที่ 3) โดย kanamycin เป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรีย และใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยยีน *npt* II แยกได้จากแบคทีเรีย Tn5 มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase II มีผลยับยั้งการทำงานของ aminoglycoside antibiotic ได้ด้วยกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ตัวอย่างของ aminoglycoside antibiotic ได้แก่ kanamycin, gentamicin และ paromomycin ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อการสร้างโปรตีนโดยจะเกาะกับ 30S ribosomal subunit จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถถอดรหัส และแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนได้ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (สุมนทิพย์, 2540)

cefotaxime เป็นสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการกำจัด *Agrobacterium* ออกจากเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดย cefotaxime จะเข้าไปจับกับเอนไซม์ peptidoglycan transpeptidase ทำให้ไม่มีการเชื่อมต่อของสาย peptidoglycan จึงมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยไม่มีผลต่อเซลล์พืช มีรายงานการใช้ cefotaxime ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดมีผลกระทบต่อการเจริญของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน โดยอาจส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส กระตุ้นการเกิดยอด และยับยั้งการเกิดยอดได้ (สุมนทิพย์, 2540) จากการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร กับเนื้อเยื่อแวววิเชียรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแวววิเชียรที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น

ความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลกับเนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุดและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdullah et al. (2005) พบว่า cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่จะนำมาใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ที่เป็นส่วนเกินในการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ส่วนงานวิจัยของกัญจนา และสุเม (2551) ใช้ความเข้มข้นของ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ในการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่หน่อของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิงค์

หลังจากการเขย่าใบอ่อนของแวววิเชียรร่วมกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pSTART ที่มียีน *gus*) เป็นเวลา 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงร่วมกันในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัด *Agrobacterium* โดยนำใบอ่อนแวววิเชียรไปล้างด้วยสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารคัดเลือก MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วคัดเลือกใบอ่อนที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี gus assay พบว่าการเขย่าใบอ่อนแวววิเชียรร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกอีก 6 สัปดาห์ สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ และมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสูงถึง 32.30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการไม่เขย่าใบอ่อนแวววิเชียร ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* (ตารางที่ 5) เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าใบอ่อนแวววิเชียรร่วมกับ *Agrobacterium* ที่สั้นเกินไป มีผลทำให้ใบอ่อนแวววิเชียรได้รับเชื้อ *Agrobacterium* น้อยโอกาสที่เกิดการส่งถ่ายยีนจึงน้อยลงด้วย ขณะที่พบว่าการใช้ระยะเวลาในการเขย่าใบอ่อนแวววิเชียรร่วมกับ *Agrobacterium* นาน 30 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกอีก 6 สัปดาห์ มีผลทำให้ใบอ่อนแวววิเชียรเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลอ่อน และมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งน่าจะเป็นเพราะเมื่อใบอ่อนแวววิเชียรสัมผัสกับเชื้อ *Agrobacterium* จะผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งการบุกรุก และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Agrobacterium* (Henrique et al., 2004) การที่ใบอ่อนแวววิเชียรสัมผัสกับเชื้อ *Agrobacterium* ปริมาณมากจึงมีการสร้างสารทุติยภูมิมากจนเกิดผลกระทบต่อการรอดชีวิต และพัฒนาการของใบอ่อนแวววิเชียรเอง

สรุปผลการวิจัย

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนแวววิเชียร คือสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดเป็นสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการทดสอบสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของใบอ่อนแวววิเชียร และเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในอาหารคัดเลือกภายหลังการส่งถ่ายยีน ขณะที่สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในอาหารคัดเลือก เนื่องจากสามารถกำจัด *Agrobacterium* ได้ ในขณะเดียวกันเป็นความเข้มข้น

สูงสุดที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อใบอ่อนแววิเชียรน้อยที่สุด ส่วนการเขย่าใบอ่อนแววิเชียรร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pSTART) ที่มียีน *gus* เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเนื้อเยื่อใบอ่อนไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนมากที่สุด และสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* บนใบอ่อน

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา แซ่เตียว และสุเม อรัญนารถ. (2551). การส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39(3): 211-214.

เต็ม สมิตินันทน์. (2557). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2 ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. หน้า 506-507.

สุมนทิพย์ บุนนาค. (2540). เอกสารคำสอนวิชา เทคโนโลยีการส่งถ่ายจีนสู่พืชชั้นสูง. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 89-94.

Abdullah, R., Zainal, A., Heng, W.Y., Li, L.C., Beng, Y.C., Phing, L.M., Sirajuddin, S.A., Ping, W.Y.S. and Joseph, J.L. (2005). Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. Electronic Journal of Biotechnology 18: 24-34.

Brugliera, F., Kalc-Wright, G., Hyland, C., Webb, L., Herbert, S., Sheehan, B. and Mason, J.G. (2000). Improvement of *Fusarium* wilt tolerance in carnations expressing chitinase. Plant Molecular Biology Reporter 18(2): 34-40.

Chandler, S.F. and Tanaka, Y. (2007). Genetic in floriculture. Critical Reviews in Plant Science 26: 169-197.

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

Fukusaki, E., Kawasaki, K., Kajiyama, S., Suzuki, C.I., Tanaka, Y. and Kobayashi, A. (2004). Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase gene with RNA interference. Journal of Biotechnology 111: 229-240.

Henrique, C., Carvalho, S., Zehr, U.B., Gunaratna, N., Anderson, J., Kononowicz, H.H, Hodges, T.K. and Axtell, J.D. (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. Genetics and Molecular Biology 27: 259-269.

Huetteman, C.A. and Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33: 105-119.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter 32: 387-405.

Katsumoto, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Brugliera, F., Holton, T.A., Karan, M., Nakamura, N., Yonekura-Sakakibara, K., Togami, J., Pigeaire, A., Tao, G.Q., Nehra, N.S., Lu, C.Y., Dyson, B.K., Tsuda, S., Ashikari, T., Kusumi, T., Mason, J.G. and Tanaka, Y. (2007). Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiology 48: 1589-1600.

Kongbangkerd, A., Koepf, A., Allacher, P., Wawrosch, C. and Kopp, B. (2005). Micropropagation of

squill (*Charybdis numidica*) through nodule culture. Plant Cell Report 23: 673-677.

Martin, K.P. (2001) Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. Plant Cell Report 21: 112-117.

Mizutani, M., Tsuda, S., Suzuki, K., Nakamura, N., Fukui, Y., Kusumi, T. and Tanaka, Y. (2003). Evaluation of post transcriptional gene silencing methods using flower color as the indicator. Plant Cell Physiology 44: 122-128.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15: 473-497.

Murthy, B., Murch, S. and Saxena, P. (1998). Review Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. Society for In Vitro Biology 31: 1071-2690.

Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi T. and Tanaka, Y. (2006). Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(29): 11075-1108.

Plaschil, S. and Olbricht, K. (2008). Histogenetic variation in flowers of *Angelonia* Humb. et Bonpl. Journal of Applied Botany and Food Quality 82: 41-46.

Seitz, C., Ameres, S. and Forkmann, G. (2007). Identification of the molecular basis for the functional difference between flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase. FEBS LeHers. 581(18): 3429-3434.

Suzuki, K., Zue, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Murakami, Y., Katsumoto, Y., Tsuda, S. and Kusumi, T. (2000). Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. Molecular Breeding 6: 239-246.

Tanaka, Y. and Ohmiya, A. (2008). Seeding is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. Current Opinion in Biology Technology 19: 190-197.

Tsuda, S., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., Holton, T.A., Kusumi, T. and Tanaka, Y. (2004). Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. Plant Biotechnology 21(5): 377-386.

Ueyama, H., Kuwayama, S., Imai, H., Tanabe, S., Oda, S., Nishida, Y., Wada, A., Shichida, Y. and Yamade, S. (2002). Novel missense mutations in red/green opsin genes in congenital color-vision deficiencies. Biochemical and Biophysical Research Communications 294: 205-209.

Wawrosch, C., Malla, P.R. and Kopp, B. (2002). Clonal propagation of *Lilium nepalense* Don., a threatened medicinal plant of Nepal. Plant Cell Report 20: 285-288.

❑❑❑❑❑