

การส่งถ่ายยีน *(CCC1)* เข้าสู่ต้นบุก (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* – MEDIATED TRANSFORMATION

วาสนา มณีจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การส่งถ่ายยีน *(CCC1)* เข้าสู่ต้นบุก (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* – MEDIATED TRANSFORMATION

วาสนา มณีจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช)
วันที่ 26 เดือน 6 พ.ศ. 2562

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ภูมิสุทธาผล)
วันที่ 26 เดือน 6 พ.ศ. 2562

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(อาจารย์ ดร.ยุวลี อันพาพรม)
วันที่ 25 เดือน 6 พ.ศ. 2562

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล)
วันที่ 26 เดือน 6 พ.ศ. 2562

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่ 27 เดือน 6 พ.ศ. 2562

ชื่อเรื่อง การส่งถ่ายยีน *(CCC1)* เข้าสู่ต้นบุก (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* – MEDIATED TRANSFORMATION

ชื่อผู้เขียน นางสาววาสนา มณีจันทร์

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญ ในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นศึกษาการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับโลหะหนักเข้าสู่ Retarded shoots ด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* โดยขั้นตอนของการส่งถ่ายยีนจะต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมด้วยเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ ในการชักนำให้เกิด Retarded shoots จะนำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนของบุกมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม N6 - benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด จำนวนยอดเฉลี่ย 4.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช เมื่อนำ Retarded shoots มาทดสอบบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Retarded shoots โดยเนื้อเยื่อที่ถูกยับยั้งจะกลายเป็นสีขาวและน้ำตาลทั้งหมด และทดสอบบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0-300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นสูงสุดที่ Retarded shoots สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่เติมปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม คือ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิด pStart โดยใช้เชื้อ *Amorphophallus tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มียีน *npt*II เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เข้าสู่เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุก พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก 11 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS assay พบว่า เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุกเกิดสีน้ำเงิน และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน 11 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาทดลองการส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่ Retarded shoots ของบุก โดยใช้แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุ pStart-*CCC1* นำ Retarded shoots แช่ในสารละลายแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียม เป็นเวลา 30 นาที แล้วเลี้ยง Retarded shoots ร่วมกับแบคทีเรีย

ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้าย Retarded shoots ไปบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการย้าย Retarded shoots ไปยังอาหารเติมทุกๆ สองสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อ Retarded shoots มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกของ pStart-*CCC1* 10 เปอร์เซ็นต์ ในการตรวจสอบการส่งถ่ายยีน *CCC1* ด้วยวิธี PCR และ RT-PCR พบว่ามีการแทรกของยีนในต้นอ่อนบุกดัดแปลงพันธุกรรม

คำสำคัญ: การโคลน, การส่งถ่ายยีน, การเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อ, ต้นบุก, CCC1

Title	GENETIC TRANSFORMATION OF GENE (*CCC1*) INTO KONJAC (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) BY *Agrobacterium* – MEDIATED TRANSFORMATION TECHNIQUE
Author	Miss Wasana Maneechant
Degree	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Ruttaporn Chundet

ABSTRACT

Contamination from heavy metals is one of the most significant environmental pollutions worldwide. In this research, we have focused on modification of plant by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of gene involved in metal accumulation. In the process of gene transformation, plant tissue culture technique is required to develop the completed shoots. Retarded shoots were cultured on MS medium supplemented with N6 – benzyladenine (BA) at concentrations of 0, 1, 2, 3 and 4 mg/l. The result showed that MS medium with concentration of 1 mg/l BA was the optimal concentration that was given the mean number of shoot at 4.6 shoot per explants. When retarded shoots were tested on MS medium supplement with kanamycin (0-100 mg/L), 50 mg/L kanamycin was the lowest concentration that could inhibit the growth of retarded shoots. All inhibited tissues turned white and brown. When retarded shoots were tested on MS medium supplement with cefotaxium (0-300 mg/L), 250 mg/L cefotaxime was the highest concentration that could promote the growth of retarded shoots.

The aim of this study was to transform pStart containing *npt*II (kanamycin resistance) and *gus* (reporter gene) gene into chromosomal DNA of retarded shoots of Konjac by *A. tumefaciencs* strain LBA4404. The results showed that the viability of transformed plant on selection medium for pStart was 11 %. The expression of *gus* gene was confirmed by histochemical GUS assay. It was noted blue color in retarded shoots of Konjac and the transformation frequency was 11 %.

The transformation of *CCC1* gene by retarded shoots of Konjac using *A. tumefaciens*-mediated genetic transformation. *A. tumefaciens* strain LBA4404 harboring pStart-*CCC1* was successful. The retarded shoots were immersed in the *Agrobacterium* suspension for 30 min by using co-cultivated system for two days in darkness. After which they were transferred to the selection medium containing antibiotics at concentration 50 mg/l kanamycin and 250 mg/l cefotaxime. Subculturing was done every two weeks for six weeks. The results showed that the survival percentage on selection medium for pStart-*CCC1* was 10 % respectively. The integration of the *CCC1* gene were confirmed by PCR and RT-PCR which indicated the integration of gene in transgenic retarded shoots of Konjac.

Keywords: Cloning, Transformation, In vitro culture, Amorphophallus paeoniifolius (Dennst), CCC1

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง "การส่งถ่ายยีน *(CCC1)* เข้าสู่ต้นบุก (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* – MEDIATED TRANSOFORMATION" เพื่อประกอบการศึกษาในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ภูมิสุทธาผล และ อาจารย์ ดร. ยุวลี อันพาพรม กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินการวิจัย ตลอดจนการตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งกับการดูแลและเอาใจใส่ในทุกเรื่องตลอดระยะเวลาของการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชณี แสงทอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศักดิ์ จูมวงษ์ รองศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์ รองศาสตราจารย์ ดร.นพมณี โทปุญยานนท์ อาจารย์ ดร.มยุรา ศรีกัลยานุกูล อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน รองศาสตราจารย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล อาจารย์ ดร.ยุวลี อันพาพรม อาจารย์ ภานรินทร์ ปรีชาวัฒนากร อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ที่ให้คำแนะนำเพิ่มเติมทำให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี และกรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาการต่าง ๆ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ นายมาลัย เบญจวรรณ นายจเร ตุ่นคำ และ นางสาวรุ่งทิพย์ กาวารี ที่ให้ความสะดวกในการทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน และเป็นกำลังใจจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนวิจัย ในงบประมาณ 36,000 บาท และให้ความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการปฏิบัติงาน

เหนือสิ่งอื่นใดขอขอบพระคุณ นางสาวเหลา มณีจันทร์ นางสาวเฉลิม มณีจันทร์ ดร.ธีรนิติ พวงกฤษ และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านกำลังใจ และสนับสนุนค่าใช้จ่ายระหว่างการศึกษา ตลอดจนความรักความห่วงใยที่มีให้ตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอบคุณ นางสาวณิชมน ธรรมรักษ์ นางสาวสาวิตรี ใจกันทะ และ ดร.วารุต อยู่คง และเพื่อนๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมทุกคน ที่ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจตลอดมาจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คุณความดี และผลของสิ่งดีดีที่เกิดขึ้นจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบให้แก่ บิดา มารดา ครูบาอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน สุดท้ายนี้ข้าพเจ้านางสาววาสนา มณีจันทร์ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจไม่มากก็น้อย

วาสนา มณีจันทร์

มิถุนายน 2562



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(9)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(12)
อักษรย่อ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจสอบเอกสาร	4
ชีววิทยาของบุก	4
ยีน *CCC1*	10
การปนเปื้อนโลหะหนักในดิน	10
โรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก	12
วิธีปรับปรุงพันธุ์พืช	12
การส่งถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*-mediated transformation	13
กรอบแนวคิด	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	23
ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดอง	23
เชื้อที่ใช้ในการทดลอง	23
พลาสมิด (Plasmid) และยีนที่ใช้ในการทดลอง	23
วัสดุและอุปกรณ์	24
เครื่องมือ	25
สารเคมี	27
ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit)	29

หน้า

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker) 29
เอนไซม์ (Enzyme) 30
คู่ไพรเมอร์ (Primer) 30
อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 30
วิธีการทดลอง 30
สถานที่ดำเนินการวิจัย 39
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 39
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 40
ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุกเพื่อใช้สำหรับการส่งถ่ายยีน 40
ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะเพื่อใช้สำหรับในการส่งถ่ายยีน 43
ส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่บุก 48
ตรวจสอบการดูดซับธาตุโลหะหนัก 54
การนำต้นอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกปลูก 54
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 56
สรุป 56
ข้อเสนอแนะ 57
บรรณานุกรม 58
ภาคผนวก 64
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 65
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายเข้มข้นและบัฟเฟอร์ 68
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย 73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของ BA ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากลำต้นอ่อนบุก	40
2	ผลของ NAA ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนบุก	42
3	ผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายส่งยีน	44
4	ผลของสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบุก	46
5	แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน gus เข้าสู้ Retarded shoots ของบุก	47
6	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็กในบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน	54

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บุกคางคก *A. paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson	4
2	*A. paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson	6
3	พลาสมิด pStart-*CCC1*	10
4	กลไกในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชของอะโกรแบคทีเรียม	14
5	การส่งถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม โดยระบบไบนารีเวกเตอร์	15
6	การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานจากสถานะพื้น(ground state) เป็นสถานะกระตุ้น (exited state)	19
7	กรอบแนวคิดในการวิจัย	22
8	พลาสมิด pStart	23
9	พลาสมิด pStart-*CCC1*	24
10	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้นอ่อนบุก	41
11	การชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนบุก	42
12	ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน	44
13	ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม	46
14	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus*	48
15	เนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่ได้รับยีน *CCC1* สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก	49
16	การสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน	50
17	การตรวจสอบการส่งถ่ายยีน *CCC1* ด้วยเทคนิค PCR	51
18	การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน	52
19	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCC1* ด้วยเทคนิค RT-PCR	53
20	การนำต้นอ่อนบุกออกปลูก	55

อักษรย่อ

2ip	Isopentenyl adenine
ANS	Anthocyanin synthase
antiMYB pH4.0	Antisense MYB pH4.0
AS	Aureusidin synthase
AS	Acetosyringone
AT	Acyltransferase
BA	6-Benzylaminopurine
bHLH	Basic helix-loop-helix
bp	Base pair
C4'GT	Chalcone 4-O-glucosytransferase
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus 35S promoter
CCC1	Yeas ion accumulation gene
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CHI	Chalcone-flavanone isomerase
CHS	Chalcone synthase
chvA	Chromosomal virulence A
chvB	Chromosomal virulence B
CTAB	Cety trimethylammonium bromide
Cytb5	Cytochrom b5
DFR	Dihydroflavonol-4-reductase
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleic acid
F3'5'H	Flavonoid-3',5'- hydroxylase
F3H	Flavanone-3- hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-hydroxylase
FLS	Flavonol synthase
FNR	Flavanon 4-reductase
FNS	Flavone synthase

GST	Glutathione S-transferase
GT	Glycosyltransferase
gus	β-glucuronidase
IAA	Indole-3-acetic acid
IMA	Imazalil
LB	Left border
LB	Luria Bertani
M	Marker
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Murashige and Skoog
MT	Methyltransferase
N	Negative control
NAA	Naphthaleneacetic acid
Nos pro	Nopaline synthase gene promoter
Nos ter	Nopaline synthase gene terminater
npt II	Neomycin phosphotransferase
P	Positive control
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
PCR	Polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RB	Right border
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
T-DNA	Transferred deoxyribonucleic acid
TDZ	Thidiazuron
TE buffer	Tris-EDTA buffer
Ti plasmid	Tumor-inducing plasmid
Ubi	Ubiuitin promoter
vir	Virulence

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ดินถือเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าเป็นอย่างมาก ดินเป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตเป็นแหล่งอาหารของพืช แต่ปัจจุบันดินเริ่มเสื่อมคุณภาพ เนื่องจากมีการใช้ประโยชน์เกินความสามารถของดิน หรือดินนั้นได้รับการจัดการดินไม่ถูกต้อง ในหลาย ๆ ประเทศที่มีการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมมักจะประสบปัญหาการปนเปื้อนสารพิษโลหะหนักในดิน มลพิษเหล่านี้ก่อให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศ เช่น น้ำใต้ดิน สัตว์ พืช รวมถึงมนุษย์ เนื่องจากมลพิษเหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายต่ำ จึงก่อให้เกิดการสะสมและตกค้างในสิ่งแวดล้อม (ดวงกมล, 2556)

สำหรับประเทศไทยในปัจจุบันเป็นประเทศหนึ่งที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนโลหะหนักในดิน เนื่องจากมีกิจกรรมหลายประเภทที่เป็นแหล่งกำเนิด และนำโลหะหนักมาใช้กันมาก เช่น ในด้านอุตสาหกรรม ด้านเกษตรกรรม ส่วนใหญ่โลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน เช่น สารหนู (As), โคบอลต์ (Co), แคดเมียม (Cd), โครเมียม (Cr), ทองแดง (Cu), ปรอท (Hg), นิกเกิล (Ni), ตะกั่ว (Pb), และสังกะสี (Zn) (กรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์, 2548) โลหะหนักสามารถถ่ายทอดสู่สิ่งมีชีวิต โดยผ่านไปตามห่วงโซ่อาหารแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม เมื่อมนุษย์ได้รับจะเข้าไปสะสมในร่างกายปริมาณมากจะก่อให้เกิดอันตรายอาจพิการหรือเสียชีวิตได้ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีที่ถูกต้องในการจัดการโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดินมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) การเผาไหม้ (incineration) การระเหย (volatilization) การดูดซับโดยใช้ความร้อน (thermal adsorption) และการใช้วิธีทางชีวภาพ (biological techniques) (Noyes, 1991) แต่วิธีดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายที่สูง จึงได้มีการศึกษาการบำบัดโลหะหนักโดยใช้พืช ซึ่งเป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม มีพืชสายพันธุ์ต่าง ๆ หลายชนิดพันธุ์ที่สามารถสะสมสารตะกั่วไว้ได้โดยไม่ได้รับอันตราย สำหรับงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ต้นบุก

บุก หรือมันชูรัน (Konjac) เป็นพืชที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและมีคุณประโยชน์มากมาย บุกจัดเป็นไม้ล้มลุกที่ปลูกง่าย โตไว มีอายุหลายปีและยังมีดอกที่สวยงาม จึงทำให้เป็นพืชที่นักจัดสวนนิยมนำมาใช้ในการจัดสวนมีการส่งเสริมการปลูก โดยให้เกษตรกรปลูกใส่กระถางไว้ขายเพื่อเพิ่มรายได้ให้ครัวเรือน นอกจากนี้บุกยังสามารถใช้เป็นอาหารและสมุนไพรซึ่งชาวญี่ปุ่นและชาวจีนนิยมรับประทานเป็นอาหารเพื่อสุขภาพมานาน มีการคัดเลือกพันธุ์และปลูกเป็นการค้าเพื่อรองรับ

อุตสาหกรรมแปรรูป บุกจึงเป็นพืชทางเลือกที่มีอนาคตและลู่ทางสำคัญในการส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพอีกชนิดหนึ่ง

ยีน *CCC1* เป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งและสะสมธาตุโลหะในแวคิวโอลของเซลล์ยีสต์ โดยในงานวิจัยนี้จะได้ทำการโคลนยีน *CCC1* จาก cDNA ของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจากคุณสมบัติในการขนส่งและสะสมธาตุโลหะในแวคิวโอลนี้ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่า หากพืชได้รับยีน *CCC1* เข้าไปจะส่งผลให้พืชมีความสามารถในการดูดซับธาตุโลหะได้ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์กับด้านเทคโนยีชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อมเพื่อใช้ในการบำบัดโลหะในดิน เนื่องจากในปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนโลหะในดินกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งแวดล้อมคุณภาพผลผลิตพืชอาหารและสุขภาพของมนุษย์

นอกจากนี้แล้วในด้านการแพทย์ในปัจจุบันปัญหาภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก (Iron deficiency anemia) เป็นปัญหาที่สำคัญของสาธารณะสุข ซึ่งธาตุเหล็กเป็นส่วนประกอบสำคัญในฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) มีหน้าที่นำออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดในร่างกายด้วย การขาดธาตุเหล็กทำให้เกิดปัญหาหลายอย่าง เช่น ทำให้เด็กมีการเจริญเติบโตผิดปกติ มีความผิดปกติในระบบประสาท ความจำ ในระยะยาวทำให้เด็กมีความผิดปกติของพัฒนาการทางระบบประสาทการเรียน และพฤติกรรม ซึ่งบางส่วนไม่สามารถกลับคืนเป็นปกติได้ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องป้องกันไม่ให้เด็กมีภาวะขาดธาตุเหล็ก สำหรับในทางการรักษาจะใช้วิธีการรับประทานยาธาตุเหล็ก ซึ่งแพทย์จะให้ยาตามขนาดและน้ำหนัก หรือให้รับประทานอาหารที่มีธาตุเหล็กปริมาณสูง เช่น เนื้อสัตว์ เลือดสัตว์ เครื่องในสัตว์ ผักใบเขียวเข็ม เช่น ผักตำลึง จากภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กจึง ทำให้มองเห็นคุณประโยชน์ของอาหารที่มีธาตุเหล็กปริมาณสูง หากนำพืชที่มียีน *CCC1* ซึ่งเป็นพืชมีความสามารถในการดูดซับธาตุโลหะหนัก มาเลี้ยงในระบบปิดที่มีการให้ธาตุเหล็กเพียงอย่างเดียว อาจนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับผู้ที่เป็นโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กได้ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่เนื้อเยื่อบุก โดยใช้เทคนิค *Agrobacterium*-mediated transformation และเพื่อตรวจสอบหน้าที่และการแสดงออกของยีน *CCC1* ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน *CCC1* จากเชื้อ *Saccharomyces cereviceae* เข้าสู่บุก (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) ด้วยเทคนิคAgrobacterium-mediated transformation

2. ศึกษาการการแสดงออกของยีน *CCC1*จากเชื้อ *Saccharomyces cereviceae* เข้าสู่บุก (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) ด้วยเทคนิคAgrobacterium-mediated transformation

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุกในสภาวะปลอดเชื้อ และส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับโลหะหนักเข้าสู่บุก ซึ่งสามารถให้ยีนแสดงออกในต้นได้

2. สามารถสร้างองค์ความรู้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์บุก ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมให้ได้บุกสายพันธุ์ใหม่

3. เพื่อเป็นการพัฒนางานวิจัยพื้นฐานที่สามารถนำไปใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยา และพันธุวิศวกรรม โดยการเผยแพร่ให้ความรู้แก่สถาบันการศึกษา หรือหน่วยงานวิจัยอื่นๆที่สนใจ

4. สามารถนำส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ไปนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจสอบเอกสาร

ชีววิทยาของบุก

บุก หรือมันซูรัน (konjac) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson มีถิ่นกำเนิดทางตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัยไปจนถึงประเทศจีน ญี่ปุ่น และทางใต้ไปถึงประเทศไทย อินโดจีนและฟิลิปปินส์ แต่เป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศญี่ปุ่น (นิรนาม, 2533)

บุกเป็นพืชล้มลุก (herbaceous plant) อยู่ใต้ผิวดินได้นานถึง 6 ปี มีลำต้นเป็นเนื้ออ่อนสีต่างๆ กัน ลำต้นเป็นลำต้นเดี่ยวไม่มีกิ่งก้าน มีเพียงกลุ่มใบยอดเดี่ยวแยกสามทาง แต่ละก้านใบมีใบแบ่งแยกอีกมาก บุกที่เจริญเต็มที่จะมีดอกโผล่จากหัวใต้ดิน มีกลิ่นเหม็นเน่า มีเมล็ดติดเป็นกระจุกกับก้านดอก เวลา สุกมีสีแดง สามารถใช้ขยายพันธุ์ได้ หัวบุกมีขนาดเล็กหรือใหญ่ตามอายุ ลักษณะกลมแบน บางชนิดมี เปลือกผิวขรุขระ เนื้อในหัวบุกมีลักษณะละเอียดเรียบเหมือนแป้งในพืชหัวอื่น ๆ แต่บุกจะมีเมือกลื่นๆ ซึ่งเป็นผลึกของแคลเซียมออกซาเลท (หรรษา, 2531)



ภาพที่ 1 บุกคางคก *A. paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson

ที่มา: https://www.google.co.th/search?q=บุกคางคก&source

ชื่อไทย : บุก หัวบุก บุกคางคก บุกคุงคก เบีย เบือ มันชูรัน

ชื่อพ้อง : *A. campanulatus* Decne (non Roxb.) *A. dubius* Blume

A. sativus Blume *A. decurrens* (Blanco) Kunth

A. chatty Andre' *A. virosus* N.E. Br.

A. rex Prain *A. malaccensis* Ridl.

A. gigantiflorus Hayata *A. microappendiculatus* Engl.

A. bangkokensis Gagnepain *A. dixenii* Lars. & Lars.

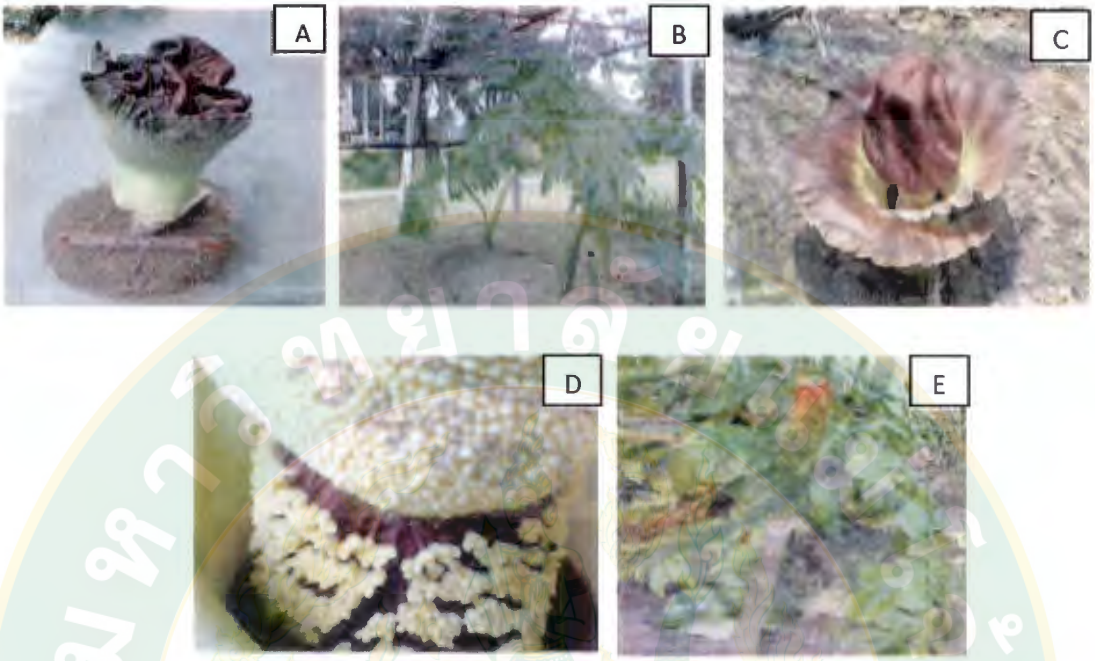
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หัว กลมแป้น ขนาดใหญ่ สีน้ำตาลเข้ม ไม่มีหรือมีหน่อเล็กรอบหัว เส้นผ่านศูนย์กลาง 20-30 เซนติเมตร

ใบ เป็นใบเดี่ยวหรือบางครั้งอาจมี 2 ใบ ใน 1 หัว ก้านใบ ยาว 1-2 เมตร สีก้านใบ สีเขียวซีด สีเขียวเข้ม หรือสีดำปนเขียว มีลวดลายเป็นวงกลมขนาดใหญ่หรือจุดสีเขียวเข้ม สีขาว ผิวก้านใบเป็นร่องและมีหนามทู่ ใบ เป็นรูปกลม รี รูปไข่ รูปไข่กลับ รูปรีขอบขนาน รูปใบหอก ปลายใบแหลม

ดอก เป็นช่อดอก ก้านช่อดอก ส่วนใหญ่สั้น 3-5 เซนติเมตร สีอ่อนและผิวเรียบกว่าก้านใบ กาบหุ้มช่อดอกคล้ายรูประฆัง ยาว 10-40 เซนติเมตรกว้างมากกว่ายาว สีกาบหุ้มช่อดอกด้านนอกสีเขียวซีดน้ำตาลเข้มสีแดงปนชมพู หรือสีเขียว ขอบของกาบหุ้มช่อดอกหยักเป็นริ้วเหมือนระบายด้วยลูกไม้ สีกาบหุ้มช่อดอกด้านในตรงโคนกาบ สีเลือดนกปนน้ำตาล ส่วนปลายสีขาวขุ่นและสีชมพูอ่อน ช่อเชิงลดมีกาบ ความยาวใกล้เคียงกาบหุ้มช่อดอก จะงอยเกสรเพศผู้คล้ายดอกบัวตูมขนาดใหญ่ ผิวย่นเป็นร่อง

ผล ลักษณะรูปไข่ สีเขียวและเป็น สีแดง เมื่อผลแก่ (ทิพวัลย์, 2545 และ Hetterscheid & Ittenbach, 1996)



ภาพที่ 2 *A. paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson (A) tuber (B) leaves (C) peduncle (D) stamen & stigma (E) berry

ที่มา: ทิพวัลย์ (2545) และ Hetterscheid & Ittenbach (1996)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง

จังหวัดพิษณุโลก แพร่ น่าน ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และชุมพร

การแพร่กระจาย

ตั้งแต่ มาดากัสการ์ อินเดีย มาเลเซีย จีนตอนใต้ อินโดจีน โพลีนีเซีย ออสเตรเลียตอนเหนือ

การใช้ประโยชน์

หัวนำไปนึ่งรับประทานกับมะพร้าวและน้ำตาล ทำแกงบวด ก้านใบนำไปทำขนมคล้ายขนมกล้วย

การขยายพันธุ์

จากการศึกษาของกลุ่มงานพฤกษชีพวิทยา กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร พบว่า การขยายพันธุ์บุกสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ (หรรษา, 2531; นิรนาม, 2533)

1. โดยวิธีการเพาะเมล็ด บุกสามารถขยายพันธุ์ได้เองตามธรรมชาติโดยเมล็ดที่ร่วงหล่นลงดิน สามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม พบว่าเมล็ดบุกส่วนใหญ่มีความงอกมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์และบุกบางชนิดมีระยะพักตัวเป็นเวลานานถึง 4 เดือน

2. โดยวิธีการแตกหน่อจากหัวเดิม บุกบางชนิดมีหน่อขนาดเล็กเป็นจำนวนมากอยู่บนหัวเดิม ซึ่งหน่อเหล่านี้ สามารถแยกไปปลูกเป็นต้นใหม่ได้หรือใช้วิธีตัดแบ่งหัวเก่าแล้วนำไปปลูกขยายพันธุ์แต่มัก มีปัญหาเรื่องหัวเน่า

3. โดยใช้เหง้า (Rhizome) บุกบางชนิดเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีเหง้าแตกออกมาจากหัวเดิม โดยรอบมีความยาว 10-30 เซนติเมตร นำเหง้ามาตัดแบ่งเป็นท่อนสั้น ๆ แล้วนำไปปลูกขยายพันธุ์ได้อีกวิธีหนึ่ง

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้มีการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนก้านใบและหน่ออ่อนในสูตรอาหาร เคมีผสม พบว่าสามารถทำให้เนื้อเยื่อเจริญ และเกิดเป็นต้นบุกมีสภาพสมบูรณ์ได้ แต่จะไม่แข็งแรง และ ต้นเติบโตช้า

5. โดยใช้หัวบนใบ (bulbil) บุกบางชนิดได้แก่ *A. mulleri* มีลักษณะเด่นกว่าชนิดอื่น คือมีหัวขนาดเล็กอยู่บนใบจำนวนหนึ่งซึ่งสามารถนำไปปลูกเพื่อขยายพันธุ์ได้ ทวีพงศ์ (2528) การขยายบุกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ทำการทดลองเลี้ยงแคลลัสบุกจากส่วนก้าน ใบและแผ่นใบในอาหารที่มี 2,4-D 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog ที่เติม NAA ร่วมกับ kinetin แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพได้รับแสงความเข้ม 1000 ลักซ์ ตลอดเวลา อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8-7 สัปดาห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีอัตราเจริญต่ำสุดในอาหารที่มี เฉพาะ NAA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จรัญ (2534) ทำการศึกษาผลของอินทรียวัตถุต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตหัวใต้ดินของบุกไข่ โดยใช้อินทรียวัตถุ 6 ชนิด ได้แก่ แกลบดิบ ถ่านแกลบ ซังข้าวโพด ปุ๋ยคอก กากละหุ่ง ซึ่งผสมดินก่อนปลูก ในอัตราส่วน 2 ตันต่อไร่ พบว่าอินทรียวัตถุทั้ง 6 ชนิด ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบุกไข่ในส่วนของ ความยาวก้านใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวใต้ดิน แต่จะมีผลต่อขนาด น้ำหนักของหัวใต้ดินและผลผลิตรวม การใช้ปุ๋ยคอกจะให้น้ำหนักเฉลี่ยของหัวใต้ดินและผลผลิตรวม สูงสุด รองลงมา คือซังข้าวโพด การละหุ่ง ถ่านแกลบ ขุยมะพร้าวและแกลบดิบตามลำดับ ส่วนการไม่ใช้อินทรียวัตถุจะให้ขนาดน้ำหนักเฉลี่ยของหัวใต้ดินและผลผลิตรวมต่ำที่สุด

การขยายพันธุ์พืชที่มีหัวใต้ดิน วิธีการหนึ่งที่เป็นที่นิยมคือ การผ่าหัว จากรายงาน รัฐภัทร และ คณะ (ม.ป.ป.) ทำการผ่าหัวพลับพลึงธาร โดยทำความสะอาดหัว ตัดรากและใบแห้งออก ผ่าหัวตามแนว ความยาว แบ่งเป็ น 2-32 ชิ้น (ขึ้นกับขนาดของหัว) ให้ตัดผ่านฐานหัว แล้วแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อรา ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm (2 กรัมต่อน้ำ1 ลิตร) ระยะเวลา 20 นาทีจากนั้นผึ่งลมจนแห้ง แล้วนำไปชำในทรายโดยใช้ทรายกลบชิ้นส่วนที่ผ่าแบ่งให้ลึกลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของหัวรดด้วยปุ๋ยน้ำ สูตร 20-20-20 ระดับความเข้มข้น 500 ppm ทุก 15 วัน พบว่าการผ่าแบ่งหัวของพลับพลึงธารออกเป็น 8 ส่วน มีความ เหมาะสมมากที่สุดในการขยายพันธุ์โดยวิธีการผ่าหัว โดยมีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ย 1.93±0.51 ต้นต่อชิ้น คิดเป็น 12.67±5.45 ต้นต่อหัว พินิจดา และฉันทนา (2543) ศึกษาการขยายพันธุ์ของว่าน แสงอาทิตย์ จากการผ่าหัวแบบ bulb cutting ในช่วงเวลาต่างๆ ของการเจริญเติบโตของต้น พบว่า สามารถขยายพันธุ์ว่านแสงอาทิตย์ โดยการผ่าหัวได้ทุกช่วงการเจริญเติบโต ตั้งแต่การผ่าหัวในเดือนสิงหาคมให้หัวย่อยที่มีขนาดเล็กกว่าในเดือนเมษายนและเดือนมิถุนายน การผ่าหัวออกเป็น 8 ชิ้นต่อหัว ให้จำนวนหัวย่อยรวมต่อหัวเดิมมากกว่าการผ่าหัวออกเป็น 4 หรือ 6 ชิ้น แต่หัวย่อยมีขนาดและน้อยกว่า จากการผ่าหัว ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการที่สามารถขยายพันธุ์บุกไข่ได้ และมีโอกาสที่จะให้ผลผลิตหัวใต้ดินสูง

ความต้องการบุกของตลาดในประเทศไทย

การปลูกบุกทั่วไป ในภาคกลางพบเป็นการปลูกแบบให้ขึ้นเองตามธรรมชาติเพื่อเก็บยอดอ่อนมาทำเป็นอาหารโดยไม่มีการดูแลรักษาอย่างจริงจัง เช่นพบในที่กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี โดยเฉพาะรังสิต และตามสวนเก่าแถวสามโคก ภาคตะวันตกพบที่ กาญจนบุรี เพชรบุรีประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้พบที่ ระนอง ภูเก็ต สุราษฎร์ธานี พังงา ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแหล่งปลูกและค้าขายอย่างชัดเจนอยู่ที่นครราชสีมา แต่ส่วนมากปลูกเพื่อบริโภคภายในครอบครัว มีการปลูกเชิงการค้าขนาด ย่อยที่อำเภอกบินทร์บุรีจังหวัดปราจีนบุรี ภาคเหนือพบธุรกิจซื้อขายบุกที่เก็บจากป่าสงวนให้กับ ชาวต่างชาติ ตั้งแต่ประมาณปี พ.ศ. 2527 พบว่าเป็นส่วนน้อยที่ปลูกเพื่อส่งขาย (ศิริทิพย์, 2546) ความต้องการหัวบุกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว 750 ตันต่อปี ในปี พ.ศ. 2527 เป็น 5,000-6,000 ตันต่อปี ในปี พ.ศ.2532 ทำให้บุกมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ในปีพ.ศ. 2534 ผู้ทำธุรกิจส่วนใหญ่จึงต้องปิดตัวลงเหลือ 2-3 บริษัท การซื้อขายเฉลี่ยอยู่ประมาณ 2,000-3,000 ตันต่อปี ซึ่งไม่เพียงพอกับความต้องการที่มากถึง 5,000-10,000 ตันต่อปี ต่อไปในอนาคตจะต้องอยู่ในสภาพขาดแคลน ส่งผลกระทบต่อ ธุรกิจที่เกี่ยวข้องอย่างแน่นอน ปัจจุบันมีบริษัทเอกชนผลิตบุกออกมาในรูปของผลิตภัณฑ์อาหารเสริม สุขภาพ อาหารลดความอ้วน ทำให้บุกเป็นที่สนใจของคนทั่วไป จึงเริ่มมีเกษตรกรสนใจที่จะปลูกบุกเพื่อ ส่งขายเป็นจำนวนมาก โดยมีแหล่งรับซื้อส่วนใหญ่คือ บริษัทสหชลผลพืชจำกัด (มงคล, 2547)

ซึ่งนับว่า การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตบุกเชิงการค้า มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อตอบสนองกับความต้องการของ ตลาดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเป็นแนวทางให้เกษตรกรที่สนใจสามารถผลิตได้ในอนาคต

การใช้ประโยชน์จากบุก

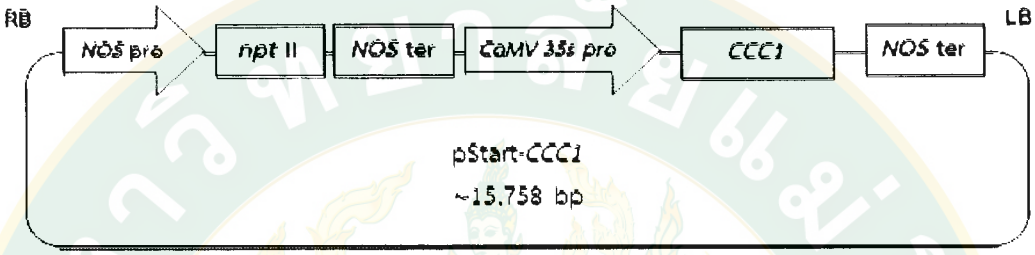
ในประเทศญี่ปุ่นมีการนำแป้งบุกเป็นส่วนผสมสำคัญในก๋วยเตี๋ยวญี่ปุ่น (shirataki) และอาหาร เช่น สุกี้ยากี้ (Brown, 2000) นอกจากการใช้บุกไปประกอบหารแล้วยังนำมาบุกปลูกเป็นไม้ประดับ เนื่องจากบุกมีใบที่สวยงาม (Follett and Douglas, 2002) ในประเทศไทยมีการนำหัวบุกมาใช้ประโยชน์ มากมายทั้งด้านอาหารและยาซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. การใช้เป็นอาหารโดยตรง บุกจัดเป็นพืชพวกอาหารและสมุนไพร มีการนำก้านใบอ่อนของหัวใต้ดินมาปรุงเป็นอาหาร ยอดอ่อนที่ใบยังไม่คลี่นำมาต้มหรือผัด หรือนำมาทำขนมแบบเดียวกับขนมกล้วย ส่วนหัวบุก นำต้ม นึ่ง หรือปิ้ง แล้วนำมาทำแกงแบบต่างๆ ส่วนลำต้นแก่จะเหนียว นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์เลี้ยง อย่างไรก็ตาม หัวบุกก่อนที่จะนำมาบริโภคจะต้องต้มในน้ำเดือดเสียก่อน มิฉะนั้นจะคันเนื่องจากมีผลึก ของแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) อยู่ (หรรษา, 2531; เพ็ญนภา, 2550) ชาวญี่ปุ่นซึ่งเป็นกลุ่ม ผู้บริโภคบุกมานานกว่า 1,000 ปี (Tye, 1991) นิยมบริโภคบุกที่ถูกแปรรูปให้อยู่ในรูปของบุกเส้น (vermicelli) หรือบุกก้อน (gel) ซึ่งรู้จักกันดีในนามของคอนนิยาขุ (koniyaku) โดยนิยมใช้ด่างเป็นตัวทำให้เกิดเจล ก่อนนำมารับประทาน จึงควรล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งจนความเป็นด่างหมดไป แล้วจึงนำมาลวกด้วยน้ำเดือดอีกครั้งและสะเด็ดน้ำให้แห้ง ก่อนนำไปรับประทานหรือปรุงเป็นอาหารอื่นต่อไป (อดิศักดิ์, 2538)

2. การใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ผลิตภัณฑ์ประเภทแยมและเยลลี่ คุณสมบัติที่สำคัญของแป้งบุกคือสามารเกิดเจลได้ เมื่อใช้ร่วมกับด่างหรือไฮโดรคอลลอยด์บางชนิด จึงทำให้นักเทคโนโลยีอาหารนำแป้งบุกมาผลิตแยม และเยลลี่ ยังได้มีการพัฒนาทำ konjac jelly โดยการผสมแป้งบุก ในสารละลายด่างต้มให้มีลักษณะข้นๆ แล้วทำให้เย็น แล้วเติมน้ำผลไม้ เช่น องุ่น พีช กีวี ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่แข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้ละลาย ณ อุณหภูมิห้อง จะเป็นเยลลี่ที่มีความคล้ายคลึงกับผลไม้สดมาก นอกจากนี้ยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ไม่เกิดเจล แป้งบุกสามารถใช้เป็นสารให้ความหนืดและให้ความคงตัวในผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ไม่เกิดเจล โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ประเภทอิมัลชั่น เช่น ไอศกรีม วิปปิ้ง ครีม และเนยแข็ง เป็นต้น

ยีน *CCC1*

ยีน *CCC1* เป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งและสะสมธาตุเหล็กในแวคิวโอลของเซลล์ ยีน *CCC1* ได้ทำการแยกมาจาก เต็มสาย cDNA ที่ได้มากจาก *Saccharomyces cerevisiae* แล้วทำการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด pStart ภายใต้การควบคุมของ Ubiquitin promoter (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 พลาสมิด pStart-*CCC1*

การปนเปื้อนโลหะหนักในดิน

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมทางดิน ทางน้ำ และทางอากาศ ก่อให้เกิดความเสียหายและเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและเป็นปัญหาสำคัญของโลกในปัจจุบัน โลหะหนักเข้าไปสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทางแหล่งที่มาหลัก ๆ ของโลหะหนัก ได้แก่ โรงงานอุตสาหกรรม การใช้สารกำจัดศัตรูพืช ปัจจุบันปริมาณของเสียจากบ้านเรือนและอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นจึงมีการใช้ประโยชน์กากตะกอนของเสียที่บำบัดแล้ว อย่างไรก็ตาม ต้องมีความระมัดระวังในการใช้เนื่องจากโลหะหนักอาจสะสมอยู่ในกากตะกอนเป็นจำนวนมาก กากตะกอนน้ำเสียถูกนำมาใช้มากขึ้นในการเกษตรเพื่อเพิ่มธาตุอาหารพืชและอินทรียวัตถุให้กับดิน กากตะกอนน้ำเสียมักมีธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม แต่ในขณะเดียวกันก็มีสารที่เป็นพิษต่อสุขภาพด้วย เช่น โลหะหนัก และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ ดังนั้นการใช้กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียเพื่อปรับปรุงดินและเพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืช ในขณะเดียวกันก็จะเพิ่มโลหะหนักลงไปในดินด้วยซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาของ Teixeira et al. (2005) พบว่า การใช้กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียเพื่อปรับสภาพดินที่เสื่อมแม้ว่ากากตะกอนจะมีโลหะหนัก เช่น นิกเกิล เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี ฯลฯ อยู่ใน ปริมาณน้อย แต่โลหะหนักเหล่านี้ก็อยู่ในสภาพที่เคลื่อนที่ได้ จึงมีแนวโน้มที่จะปนเปื้อนต่อสิ่งแวดล้อมและการสะสมโลหะหนักลงในดิน ทำให้สภาพดินเสื่อม ผลผลิตพืชที่เป็นอาหารมีคุณภาพไม่เหมาะสมต่อการบริโภคโลหะหนักที่พบในพืชขึ้นอยู่กับความเข้มข้น

และการเคลื่อนย้ายในดิน คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโลหะหนักในดิน (Antanaitis and Antanaitis, 2004) โลหะหนักจากการทำอุตสาหกรรมสามารถเข้าสู่ระบบจ่ายน้ำและน้ำบริโภคได้ สารพิษที่เป็นโลหะหนัก ได้แก่ ตะกั่ว โครเมียม ปรอท ยูเรเนียม ซีลีเนียม สังกะสีสารหนู แคดเมียม เงิน ทอง และนิกเกิล ปัจจุบันโลหะหนักเป็นปัญหาของแหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก โลหะหนักเป็นสารที่ไม่เสื่อมสลายทางชีวภาพ จากการทิ้งของเสีย มลภาวะจากดิน และน้ำ โลหะหนักสวมารถเข้าไปอยู่ในสายใยอาหารได้ (food web) ปริมาณโลหะหนักที่เพิ่มขึ้นและมีระดับสูงขึ้นจนเกิดการรับและสะสมสารพิษในห่วงโซ่อาหาร เรียกว่า "bio-magnification" โลหะหนักความเข้มข้นต่ำก็เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นได้ (Alluri et al., 2007) โลหะหนักสามารถทำลายระบบประสาท ตับ กระดูก และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถจับกับโปรตีนและป้องกันไม่ให้มีการจำลองดีเอ็นเอในการแบ่งตัวของเซลล์ การหลีกเลี่ยงอันตรายต่อสุขภาพจำเป็นต้องกำจัดเอาโลหะหนักปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือจากชุมชนที่อยู่อาศัยออกก่อนทิ้งลงสู่แหล่งน้ำ

วิธีการกำจัดโลหะหนักปนเปื้อนในน้ำเสียอุตสาหกรรมมี 3 วิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ

1. การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) เป็นการกระทำทางไฟฟ้าสถิต (electrostatatic interaction) เช่น การดูดซับทางชีวภาพของทองแดงโดยแบคทีเรีย *Zooglea ramigera* และสาหร่าย *Chorellavulgaris*

2. การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange) ได้แก่ การดูดซับทางชีวภาพของทองแดงโดยรา *Ganodermalucidium* และ *Asperigillus niger*

3. การเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Complexation) ได้แก่ การดูดซับทางชีวภาพของทองแดงโดย *Zooglea ramigera* และ *Chorella vulgaris* ที่เกิดขึ้นโดยการผ่านการดูดซับและการเกิดพันธะโคออร์ดิเนตระหว่างโลหะกับหมู่อะมิโน (amino) หรือ หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ของผนังเซลล์ กลไกที่กล่าวมาแล้วนี้อาจเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันได้

การกำจัดธาตุโลหะหนักในปัจจุบัน

การเลือกใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการบำบัดดิน ที่ปนเปื้อนสารมลพิษ เช่น โลหะหนัก ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ลักษณะหรือสภาพภูมิประเทศของ พื้นที่ปนเปื้อน สมบัติหรือลักษณะของดินที่ปนเปื้อน เช่น พีเอช หรือสภาพรีดอกซ์ และชนิดหรือปริมาณ ของสารมลพิษในดินหรือตะกอน แนวทางหลักสำหรับการบำบัดสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การบำบัด ภายในพื้นที่ *(in situ)* และการบำบัดภายนอกพื้นที่ *(ex situ)* (Peng et al., 2009) จุดประสงค์หลักของการ บำบัดในพื้นที่ส่วนใหญ่มักเป็นการเพิ่มความคงสภาพ ของสารมลพิษ หรืออาจเป็นการเคลื่อนย้ายสิ่ง

ปนเปื้อน โดยการใช้พืชบำบัด (phytoremediation) ข้อดีของ การบำบัดในพื้นที่คือ กระบวนการบำบัดที่ไม่ยุ่งยาก และมีต้นทุนในการบำบัดที่ค่อนข้างต่ำ แต่การบำบัด ด้วยวิธีนี้ก็ยังมีข้อเสียอยู่ เนื่องจากเป็นเพียงการ เปลี่ยนแปลงสภาพการละลายของสิ่งปนเปื้อนให้อยู่ ในรูปที่มีการละลายต่ำ และไม่ปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม จึงไม่ได้เป็นการกำจัดสารมลพิษที่แท้จริงและอาจมี การปลดปล่อยสู่สภาพแวดล้อมอีกครั้งเมื่อสภาพ แวดล้อมที่ถูกบำบัดถูกเปลี่ยนแปลงไป ส่วนการบำบัด ภายนอกพื้นที่ มักเป็นการสกัดหรือแยกสารมลพิษออก จากตัวตะกอนหรือวัสดุด้วยวิธีทางเคมี กายภาพหรือ ทางชีวภาพ โดยมีข้อดีคือสามารถกำจัดโลหะหนัก ที่เคลื่อนย้ายได้ง่ายออกเกือบทั้งหมด แต่มีข้อเสีย คือ เรื่องต้นทุนในการบำบัดที่มีค่าใช้จ่ายที่สูงซึ่ง ไม่เหมาะสมกับพื้นที่ปนเปื้อนที่มีพื้นที่กว้างขวาง

โรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก

ภาวะโลหิตจางเกิดได้จากหลายสาเหตุ โดยที่พบบ่อยที่สุดคือโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก เหล็กที่เราพูดถึงกันนี้ไม่ใช่เหล็กเป็นแท่งๆ แต่จะหมายถึงธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปแร่ธาตุซึ่งเป็นส่วนประกอบในเซลล์ต่างๆของร่างกาย เราจะได้รับธาตุเหล็กจากอาหารเป็นหลัก โดยอาหารที่พบธาตุเหล็กมาก ได้แก่ เนื้อสัตว์เนื้อแดง เครื่องในสัตว์ เช่น ตับ นอกจากนี้ ยังพบธาตุเหล็กได้ในผักใบเขียว และธัญพืช แต่ธาตุเหล็กในอาหารประเภทหลังนี้จะถูกดูดซึมได้ไม่ดีเท่าธาตุเหล็กจากอาหารพวกเนื้อสัตว์และอาจมีสารยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กได้ด้วย อาหารและเครื่องดื่มบางประเภทอาจมีผลยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กได้ เช่น ชา กาแฟ ผู้ที่รับประทานยาเสริมแคลเซียมก็อาจไปรบกวนการดูดซึมธาตุเหล็กหากรับประทานพร้อมกัน ส่วนอาหารที่วิตามินซีสูง เช่น ผลไม้รสเปรี้ยว พบว่าช่วยการดูดซึมธาตุเหล็กให้ดีขึ้นได้บ้าง เมื่อรับประทานอาหารที่มีธาตุเหล็กแล้ว จะเกิดการดูดซึมธาตุเหล็กต่อโดยอาศัยความเป็นกรดในกระเพาะอาหารช่วย การดูดซึมจะเกิดที่ลำไส้เล็กส่วนต้น หลังจากนั้นจะมีโปรตีนส่งธาตุเหล็กไปตามเซลล์ต่างๆและไปเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ โดยกว่าสองในสามของธาตุเหล็กในร่างกายจะอยู่ในเม็ดเลือดแดงในส่วนที่เรียกว่า “ฮีม” ซึ่งจะเป็นส่วนที่ช่วยในการจับกับออกซิเจนและส่งไปให้ส่วนต่างๆของร่างกายนั่นเอง ส่วนที่เหลือของธาตุเหล็กจะถูกเก็บสะสมไว้ในตับ ม้าม และไขกระดูก

วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช

1. การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (Traditional plant breeding) เป็นการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศระหว่างเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย รอจนติดผล แล้วนำออกปลูกเพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่ต้องการ ซึ่งต้องใช้เวลานานหลายปีกว่าจะผสมได้พันธุ์ที่ต้องการ หรืออาจไม่ได้เลย ไม่สามารถคัดเลือกในระดับ

พันธุกรรมได้ อีกทั้งบางลักษณะอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนมากกว่ายีนเดียว ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ จะเป็นการรวมลักษณะดีหลายลักษณะเข้าไว้ด้วยกันในต้นเดียว บางครั้งอาจจะเสียลักษณะที่ดีออกไปเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการเท่านั้น (เช่น ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูง แต่คุณภาพลดลง) วิธีการนี้ต้องใช้แรงงานมากทั้งในการผสม และการคัดเลือก (นพมณี, 2545)

2. การปรับปรุงพันธุ์พืชอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ปัจจุบันมีข้อมูลเพิ่มมากขึ้นเกี่ยวกับสารพันธุกรรม หรือโครงสร้าง และหน้าที่ของยีนที่ควบคุมคุณลักษณะต่างๆ ในต้นพืช รวมถึงเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีคุณลักษณะตามที่ต้องการได้โดยใช้เวลาไม่นานนัก การประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการดัดแปลงพันธุกรรมพืชจึงต้องมีข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับชนิดของพืชที่ต้องการดัดแปลงพันธุกรรม เช่น ต้องการให้พืชสังเคราะห์แอนโทไซยานินชนิดใดควรที่จะต้องศึกษาวิถีการสังเคราะห์สารชนิดนั้นว่ามียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ชนิดใดบ้าง เป็นต้น ขั้นตอนที่ต้องเกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายยีน คือการโคลนยีน (Gene cloning) ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ชนิด จากนั้นต้องพัฒนาระบบการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชที่ต้องการดัดแปลงพันธุกรรม (Plant tran)

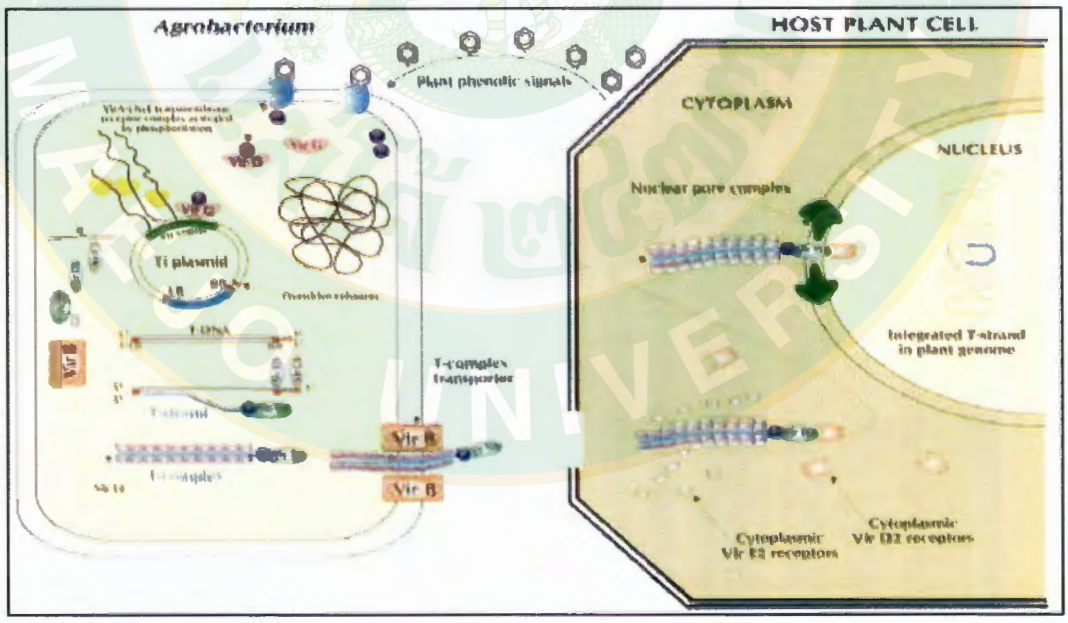
การส่งถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*-mediated transformation

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่เรียกว่า Ti plasmid (Tumor-inducing plasmid) โดยธรรมชาติแล้วแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการส่งถ่ายดีเอ็นเอบางส่วน (Transferred DNA หรือ T-DNA) เข้าสู่เซลล์พืช ชิ้นส่วนของ T-DNA ที่ถูกส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชประกอบด้วยยีนที่กำหนดการสังเคราะห์สารโอปีน (Opine synthesis gene) ซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรีย และยีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน (Oncogene) เมื่อ T-DNA แทรกตัว (Integrate) อยู่ในโครโซมพืชทำให้เซลล์พืชแบ่งตัว ขยายขนาดอย่างรวดเร็ว และเกิดเป็นโรคปุ่มปม (Crown gall disease) (Slater et al., 2003) ขอบเขตของ T-DNA ที่จะถูกส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์พืชกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า Left border (LB) และ Right border (RB) กระบวนการส่งถ่ายยีนจะถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบ Phenolic จากพืช คือ Acetosyringone (AS) ซึ่งพืชจะปล่อยออกมาเมื่อเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายยีนจะถูกควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งโครโมโซมของแบคทีเรีย และ *vir* gene ที่อยู่บนพลาสมิด Ti โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *vir D* ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบ DNA สายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางขวา (RB) ไปเรื่อยๆ ส่วน RB นี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้น DNA ที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าไม่มีส่วน LB กางส่ง T-strad ก็เกิดขึ้น

ได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอนเพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2545) การส่งถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ให้จำนวนชุดของยีนที่เข้าไปในจีโนมพืชมีจำนวนน้อยชุด มีการแทรกของยีนเข้าไปในจีโนมพืชที่แน่นอน มีการจัดเรียงตัวใหม่น้อย และมีการแสดงออกที่คงที่กว่าวิธีการส่งถ่ายยีนโดยตรง (Hu et al., 2003)

กลไกในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชของ *Agrobacterium tumefaciens*

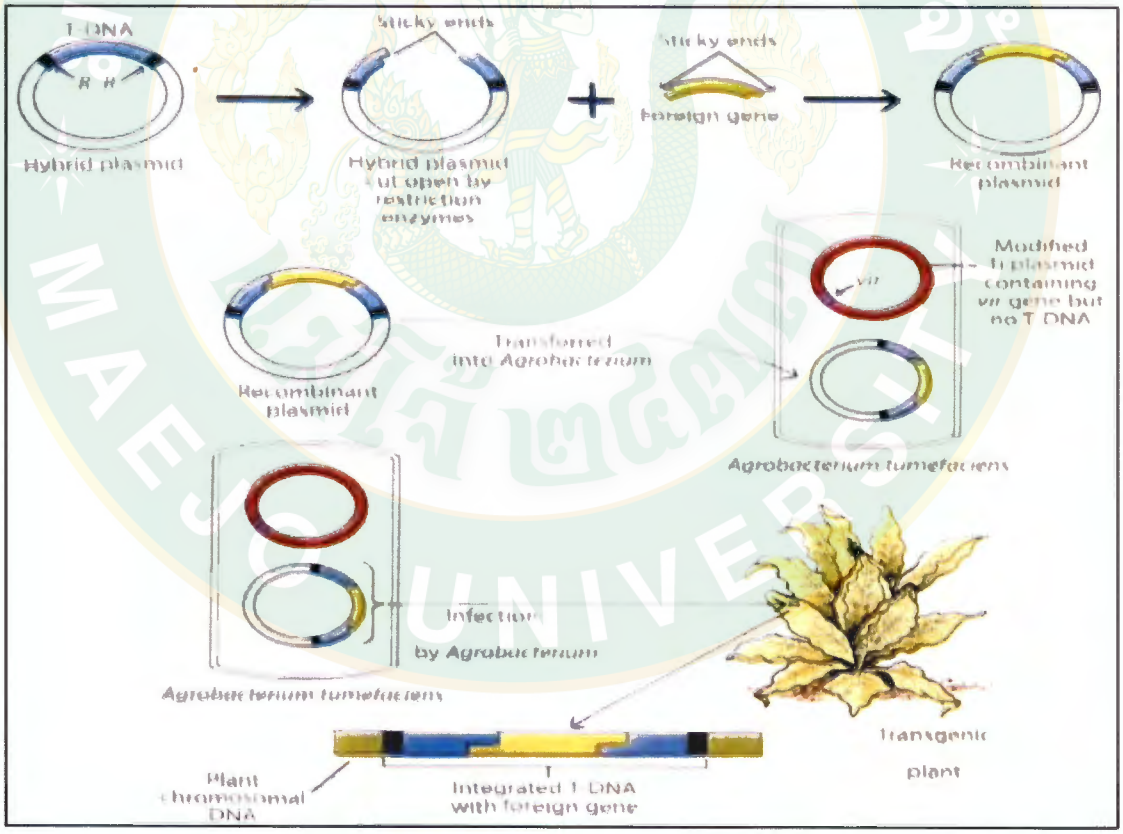
ผลผลิตของยีน *chv A* และ *chv B* ที่อยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปเกาะกับเซลล์ของพืชที่เกิดบาดแผล พืชที่เกิดบาดแผลสังเคราะห์ AS แล้วปล่อยเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โปรตีนจากยีน *vir A* จดจำ AS และร่วมตัวกันไปกระตุ้นให้ *vir G* ทำงาน สาร AS และโปรตีนจากยีน *vir G* ไปกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนที่เหลือ โปรตีนจาก *vir D* ซึ่งผลิตเอนไซม์ Endonuclease ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง RB และ LB เกิด T-DNA สายเดี่ยว หรือ T-strand โดยที่ T-strand จะเข้าไปในเซลล์พืช และแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช เกิดการแสดงออกของยีนในส่วนของ T-DNA ทำให้สามารถผลิตสารโอปีน (Opine synthesis gene) ซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรีย และยีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนออกซิน และไซโตไคนิน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กลไกในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชของอะโกรแบคทีเรียม

ที่มา : สุรินทร์ (2545)

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้กลไกทางธรรมชาติเพื่อส่งถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่เซลล์พืช อย่างไรก็ตามเพื่อป้องกันการเกิดโรคปุ่มปมในพืช นักวิทยาศาสตร์ได้มีการตัดยีนส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนออกซิน และไซโตไคนินออก และเชื่อมต่อชุดยีนเป้าหมายเข้าไปแทน การส่งถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมอาศัยระบบไบนารีเวกเตอร์ (Binary vector) ซึ่งประกอบไปด้วย เวกเตอร์ (Vector) 2 ชนิด ได้แก่ เวกเตอร์ที่มีชุดยีนเป้าหมายทั้งหมด และเวกเตอร์ที่มีกลุ่มยีนที่ช่วยในกระบวนการส่งถ่ายยีน (*Virulence* or *vir* genes หรือ Helper plasmid) เวกเตอร์ที่มีชุดยีนเป้าหมายจะถูกส่งถ่ายเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่มี Helper plasmid อยู่แล้ว จากนั้นเมื่อระบบการส่งถ่ายยีนได้รับการกระตุ้นด้วยสารประกอบ Phenolic เช่น AS เชื้อแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมจะเริ่มกระบวนการส่งถ่ายยีนเป้าหมายจนกระทั่งสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของพืช เช่น กุหลาบ และมะเขือเทศ (ภาพที่5) (Raven et al., 1999; Slater et al., 2003) ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในกระบวนการส่งถ่ายยีนแตกต่างกันไป สามารถใช้ชิ้นส่วนใดของพืชก็ได้ เช่น แคลลัส (Callus) และใบของพืช เป็นต้น



ภาพที่ 5 การส่งถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม โดยระบบไบนารีเวกเตอร์

ที่มา: Raven et al. (1999)

ปัจจัยที่มีผลต่อการส่งถ่ายยีนโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ปัจจัยต่างๆ มีผลต่อประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน จากรายงานของ Chyi และ Philips (1987) พบว่า ความสำเร็จของการส่งถ่ายยีนด้วยเชื้อแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมจะขึ้นอยู่กับขั้นตอนที่สำคัญได้แก่ กระบวนการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ และการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้มีประสิทธิภาพ รวมทั้งการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชเพื่อการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบรูณ์ โดยสามารถแบ่งได้เป็นปัจจัยสำคัญดังต่อไปนี้

1. ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการส่งถ่ายยีนเป็นสิ่งสำคัญ การเลือกใช้เนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีความสามารถในการเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นต้นได้ค่อนข้างสูง เป็นแนวทางหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน โดยชิ้นส่วนที่นิยมใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการส่งถ่ายยีน คือ แคลลัส (callus) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้สำหรับการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช และให้ประสิทธิภาพสูง มีการแสดงออกของยีนทุกเซลล์ แต่มีข้อเสียต้องอาศัยระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ และต้องมีการเปลี่ยนอาหารหลายสูตรในการชักนำให้เกิดต้น รองลงมาคือชิ้นส่วนใบอ่อน และปลายยอด

2. วิธีการส่งถ่ายยีน และสภาวะการเพาะเลี้ยงร่วม เมื่อพืชเกิดบาดแผลจะมีการสร้างสารพวกลิกนินเพื่อปิดปากแผลโดยไม่ให้เกิดการแบ่งเซลล์ (Kahl et al., 1982) และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวผลิตสารประกอบฟีโนลิก ได้น้อยจึงต้องมีการเติม AS ให้เหมาะสมต่อการทำงานของ *vir* gene ใน พลาสมิด Ti ที่อยู่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เพื่อกระตุ้นการทำงานของ *vir* gene ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และในองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วม (Smith and Hood, 1995) โดย Mahadtanapuk et al. (2006) รายงานว่าการเติม Acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (uM) เป็นปัจจัยที่ช่วยให้การส่งถ่ายยีนในปทุมมาประสบความสำเร็จ และได้พืชดัดแปลงพันธุกรรมจำนวนมาก และพืชเหล่านี้สามารถถ่ายถอดยีนไปยังรุ่นลูกหลานได้

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช ไม่สามารถยืนยันผลได้โดยดูจากลักษณะทางกายภาพเพียงอย่างเดียว เพราะอัตราการส่งถ่ายยีนค่อนข้างต่ำ จำเป็นต้องใช้ยีนเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน (Angenon et al., 1994) โดยยีนเครื่องหมายจะแทรกอยู่ในส่วนของเวคเตอร์ และจะแทรกเข้าไปในโครโมโซมพืช หลังการส่งถ่ายยีนเซลล์พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนจะแสดงลักษณะการต้านทาน และสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารเคมี หรือสารปฏิชีวนะ โดยเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่ไม่ได้รับยีนจะไม่สามารถเจริญได้ และตายในที่สุด (Komari et al., 1996) โดยการคัดเลือกจำเป็นต้องมีปริมาณ หรือความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการคัดเลือกที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์ที่ได้รับยีนต่อไป โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ใช้ในการ

คัดเลือกด้วย เช่น เซฟโฟแทกซิม (Cefotaxime) มีผต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช หากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เนื้อเยื่อพืชบางส่วนค่อยๆ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซีด และตายในที่สุด ในขณะที่ไทเมนทิน (Timentin) มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และพัฒนาเป็นต้น เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับออกซิน (เกศณี, 2546)

3. สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการบุกรุกพืชแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับยีน *vir* โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน *vir A* และ *vir G* ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ตำแหน่งอื่นๆ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *vir G* ทำให้มีประสิทธิภาพการเข้าทำลาย หรือการส่งถ่ายยีนเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *vir G* ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเข้าทำลาย ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้ (กษิดิฐ, 2544) นอกจากนี้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีผลต่อพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทำให้ประสิทธภาพในการส่งถ่ายยีนแตกต่างกันไปด้วย โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการตอบสนองต่อปัจจัยต่างๆ กัน ความสามารถในการส่งถ่ายยีนจะขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน *vir*

4. เวคเตอร์ การเลือกใช้ชนิดของเวคเตอร์ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชมีความสำคัญ เนื่องจากเวคเตอร์เป็นส่วนสำคัญจะมีการเติม poly CAA และ CT motif บริเวณ 5'UTR ที่อยู่หลังโปรโมเตอร์ ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกมากขึ้น โดยจะมีการดัดแปลงพลาสมิด Ti โดยการตัดส่วนที่จะทำให้เกิดโรคปุ่มปมในพืชออก และแทนทีด้วยยีนที่สนใจ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ Co-integrate vector (Hood et al., 1986) และไบนารีเวกเตอร์ (Komari et al., 1996) ซึ่งแต่ละระบบจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน และส่งผลให้เกิดประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด

Gus assay

ยีนรายงานผล เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเทคนิคในการถ่ายยีน และใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะความต้านทาน สามารถตรวจสอบการแสดงออกได้โดยตรงบนเนื้อเยื่อเป้าหมาย ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้แก่ ยีน gusA (uidA) ที่เป็นยีนสร้างเอนไซม์ b-glucuronidase (GUS) ได้จากเชื้อ *Esherichia colli* stain K12 ใช้ตรวจสอบกับสารตั้งต้นในปฏิกริยา (substrate) ในวิธีการต่างๆ เช่น spectometric (p-nitrophenyl-b-D-glucuronidase), fluorometric (4-methylumbelliferyl glucuronide) และ histochemical (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- glucuronide) assay ผลที่ได้จะแสดงออกในรูปสารสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชที่มียีน สามารถทำการตรวจสอบได้ง่าย มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีผลต่อกระบวนการเมตาบอริซึม

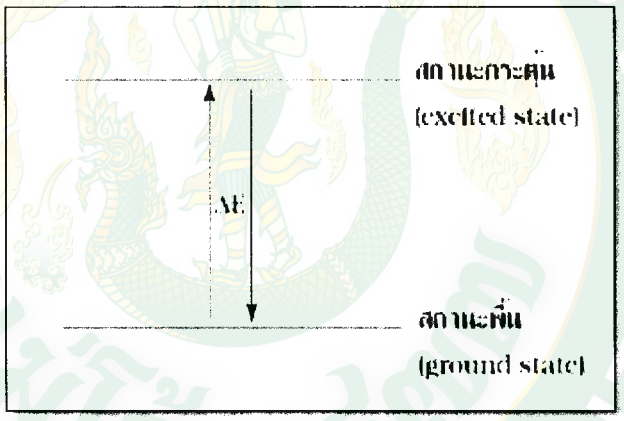
polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาซึ่งอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยาในหลอดทดลอง *(in vitro)* ของเอนไซม์ DNA polymerase ในการเพิ่มทวีปริมาณ (106 – 109 เท่าของ template ตั้งต้น) DNA fragment ที่สนใจ ด้วยคู่ของ DNA primer ที่ถูกออกแบบให้มี ความจำเพาะเจาะจง (Mullis et al., 1986 และ Saiki et al., 1988) ในการตรวจสอบและศึกษาการแสดงออกของยีนนั้นไม่สามารถใช้ได้โดยตรงกับเทคนิค PCR ส่วนใหญ่ซึ่งมีจีโนม (genome) เป็น RNA อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเทคนิควิธี reverse transcription (RT) สามารถ สังเคราะห์ cDNA จาก RNA (genome) template โดยการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase ร่วมกับ DNA primer และใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็น template ตั้งต้น ใน PCR (RT-PCR) ปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์โพรีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ซึ่งเป็นวิธีการในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณในจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อคู่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ในหลอดทดลอง จัดเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการนำมาประยุกต์เพื่อการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ในการเกิดปฏิกิริยาของ PCR สายคู่ของดีเอ็นเอจะถูกทำให้แยกออกจากกัน เป็น 2 สาย โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 94 -96 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อระดับอุณหภูมิลดต่ำลงมายังที่ระดับ 40 – 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิที่สามารถเกิดการเกาะจับ (binding) ของดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ทั้งสองเส้น บนตำแหน่งของดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นสายคู่สม (complementary) กับลำดับเบสบนดีเอ็นเอไพร์เมอร์ โดยดีเอ็นเอไพร์เมอร์แต่ละตัว จะมีตำแหน่ง อยู่ที่บริเวณปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอบริเวณที่จะมีการเพิ่มปริมาณ โดยเหตุที่ไพร์เมอร์นั้นเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) ที่มีความยาวไม่มากนัก ซึ่งสามารถเกาะจับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการเข้าคู่กันของเบส (base) ที่มีความเป็นคู่สม (complementary) ทำให้มีการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์และได้ผลผลิตที่มีความจำเพาะ เจาะจง การสร้างสายที่สองของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นสายคู่สม ที่ระดับอุณหภูมิ 68 – 72 องศา เซลเซียส มีการสังเคราะห์ต่อให้ได้สายที่ยาวขึ้นจากไพร์เมอร์ด้วย ดีอ๊อกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตร ฟอสเฟต (deoxyribonucleoside triphosphates : dNTPs) โดยเอ็นไซม์โพรีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งมีความเสถียร (คงทน) ที่อุณหภูมิสูง (thermostable) การเพิ่มปริมาณของ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดภายใต้สภาพของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามระดับที่แตกต่างอย่างต่อเนื่อง โดยมีการซ้ำหลายรอบ (25 ถึง 40 รอบ) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง และให้ผลผลิตหลายล้านเท่าจากดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอแม่แบบที่มีปริมาณน้อยมากๆ

Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)

Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุ (metal element) ที่อยู่ในตัวอย่างทดสอบ ด้วยเทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy ซึ่งเป็นกระบวนการที่อะตอมอิสระ(free atom) ของธาตุ ดูดกลืน(absorp) แสงที่ความยาวคลื่นระดับหนึ่งโดยเฉพาะซึ่งขึ้นอยู่กับธาตุแต่ละธาตุ

เนื่องจากธาตุแต่ละชนิดมีระดับของพลังงานแตกต่างกันจึงมีการดูดกลืนพลังงาน ได้แตกต่างกัน พลังงานที่พอดีกับคุณสมบัติเฉพาะของธาตุจะทำให้อิเล็กตรอนของธาตุนั้นๆ เปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้น(ground state) ไปเป็นสถานะกระตุ้น (exited state)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานจากสถานะพื้น (ground state) เป็นสถานะกระตุ้น (exited state)

ที่มา: http://science.skru.ac.th

องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่อง AAS จะมีด้วยกัน 5 ส่วน ดังนี้

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) แหล่ง กำเนิดแสงของ AAS โดยทั่วไป เป็นหลอดแบบ hollow cathode lamp (HCL) และ electhodeless discharge lamp (EDL) โดยแหล่งกำเนิดแสงของ AAS ของเครื่องที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ฯ มีปัจจุบัน เป็นชนิด hollow cathode lamp (HCL) ซึ่งในหลอด(lamp) จะบรรจุ buffer ของแก๊สเฉื่อย(inert gas) เช่น แก๊สอาร์กอน(Ar) หรือ นีออน(Ne) และมีการเคลือบเกลือของธาตุโลหะที่จะวิเคราะห์ไว้ที่ขั้ว cathode ของ lamp โดยจะมี

การให้ศักย์ไฟฟ้า(apply voltage) ให้แก่ขั้ว cathode เกิดการ ionization ของ inert gas ไปชนกับเกลือของธาตุโลหะที่เคลือบไว้ ทำให้ธาตุโลหะหลุดออกจากขั้ว cathode แล้วไปชนกับ inert gas ทำให้ธาตุโลหะเปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้น(ground state) ไปเป็นสถานะกระตุ้น(exited state) แต่ไม่เสถียร จึงปล่อยพลังงานออกมาเป็นพลังงานแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะกับธาตุแต่ละธาตุซึ่ง hollow cathode lamp มีทั้งแบบ single lame (ปล่อยพลังงานช่วงความยาวคลื่นสำหรับวิเคราะห์ธาตุใดธาตุหนึ่ง) และ แบบ multiple lamp (ที่ขั้ว cathode จะเคลือบเกลือของธาตุโลหะหลายชนิด มีการปล่อยพลังงานในหลายช่วงตามระดับพลังงานของธาตุที่เคลือบไว้ จะอาศัย monochromator ในการเลือกแสงที่ระดับความยาวคลื่นที่ต้องการใช้)

2. ส่วนที่ทำให้ธาตุกลายเป็นอะตอมอิสระ (atomizer หรือ atomization process) การทำให้อะตอมของธาตุในสารประกอบเกิดเป็นอะตอมอิสระได้นั้น ต้องมีการดูดกลืนพลังงานความร้อนเข้าไป ซึ่งพลังงานดังกล่าวอาจอยู่ในรูปต่างๆ เช่น พลังงานความร้อนจากเปลวไฟ พลังงานความร้อนจากกระแสไฟฟ้า เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบของเครื่อง AAS ที่ให้พลังงานความร้อนเพื่อทำให้เกิดอะตอมอิสระนั้นเรียกว่า atomizer และกระบวนการที่ทำให้เกิดอะตอมอิสระนั้นเรียกว่า Atomization process ซึ่ง Atomization process ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ Flam Atomization, Electrothermal atomization หรือ Graphite furnace หรือ flameless atomization , Hydride Generation Techique และ Cold Vapor Technique โดยมีรายละเอียดของแต่ละเทคนิคดังนี้

2.1. Flam Atomizationใช้พลังงานความร้อนจากเปลวไฟทำให้เกิด atomization process แบ่งเป็น 5 ขั้นตอน ได้แก่

1) Nebulization เป็นกระบวนการเปลี่ยนของเหลวให้เป็นละอองฝอยเล็กๆ(mist หรือ aerosol) ด้วยส่วนของเครื่องที่เรียกว่า nebulizer โดยเครื่องจะดูดสารละลายเข้าไปเพื่อพ่นให้สารละลายไปชนกับ glass bead เพื่อให้เกิดเป็นละอองฝอย

2) Droplet precipitation> เป็นกระบวนการที่ละอองเล็กบางส่วน รวมกันเป็นหยดสารละลาย ไม่สามารถลอยอยู่ในอากาศได้จึงตกลงมาแล้วออกไปทางท่อน้ำทิ้ง (drain)

3) Mixing เป็นกระบวนการที่ mist หรือ aerosol ผสมกับแก๊สเชื้อเพลิง(fuel) และออกซิเดนท์แก๊ส (oxidant gas) เกิดใน spray chamber ของ nebulizer

4) Desolvation เป็นกระบวนการที่ตัวทำละลายที่อยู่ใน mist หรือ aerosol ถูกกำจัดออกไปทำให้เป็นอนุภาคเล็กๆ ของสารประกอบ (solid paticles)

5) Compound decomposition เป็นกระวนการที่เกิดขึ้นในเปลวไฟ โดยพลังงานความร้อนจากเปลวไฟทำให้สารประกอบเกิดการแตกตัวเป็นเป็นออกไซด์ เป็น โมเลกุลและเป็นอะตอมอิสระ

2.2. Electrothermal atomization หรือ Graphite furnace หรือ flameless atomization ใช้พลังงานความร้อนจากกระแสไฟฟ้าทำให้เกิด atomization process แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

1) Drying stage เป็นการค่อยๆ ให้ความร้อนแก่สารตัวอย่าง เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป โดยปกติใช้อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 100°C)

2) Ashing stage เป็นขั้นตอนที่ให้ความร้อนสูงขึ้น (อาจถึง 1,500 °C) เพื่อกำจัดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยเลกุลของสารเหล่านั้นจะแตกตัวออกไปเหลือแต่สารอนินทรีย์ที่เสถียรเท่า นั้น โดยทั่วไปอยู่ในรูปของโลหะออกไซด์

3) Atomization stage เป็นขั้นตอนที่สารที่เหลืออยู่ถูกเผาที่อุณหภูมิสูง (อาจถึง 3,000 °C) เพื่อให้สลายเกิดเป็นอะตอมอิสระ

2.3. Hydride Generation Techique เนื่องจากธาตุบางชนิดจะเปลี่ยนให้เป็นอะตอมโดยตรงด้วยเทคนิค Flam Atomization และ Electrothermal atomization ไม่ได้ จำเป็นต้องใช้วิธีทำให้แตกตัวในบรรยากาศที่ปราศจากออกซิเจนเพื่อป้องกันการ รวมกับออกซิเจน ดังนั้น จึงต้องใช้วิธีทำให้ธาตุเหล่านั้นกลายเป็นสารที่เป็นไอได้ง่ายๆ ที่อุณหภูมิห้องด้วยการ reduce ให้เป็น hydrided แล้วให้ hydrided นั้นผ่านเข้าไปในเปลวไฟไฮโดรเจนจะทำให้ธาตุกลายเป็นอะตอมอิสระได้ เทคนิคนี้ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุ As, Bi, Se, Pb, Sb, Sn และ Te

2.4. Cold Vapor Technique จัดเป็นวิธี flameless atomization แบบ Vapor Generation ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุบางชนิดที่เปลี่ยนเป็นไอได้ง่าย ซึ่งได้แก่ การวิเคราะห์ปรอท โดยใช้การ reduction ของสารประกอบปรอท

3. Monochromator ใช้แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นของแสงที่ต้องการ (wavelength selector)

4. Detector ของ AAS เป็นชนิด Photo Multiplier Tube (PMT)

5. เครื่องประมวลผลและอ่านผล

กรอบแนวคิด



ภาพที่ 7 กรอบแนวคิดในการวิจัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

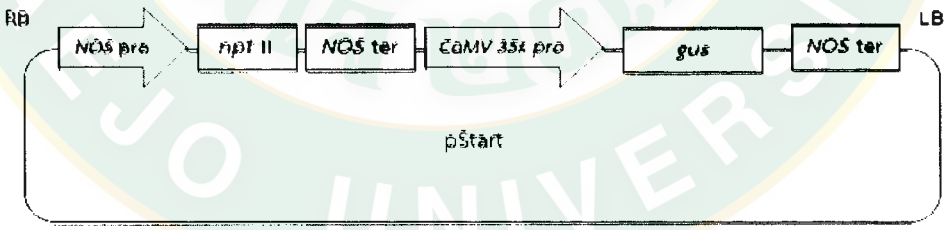
บุก (Konjac) *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Agrobacterium tumefaciens สายพันธุ์ LBA4404 ได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. รัฐพร จันทร์เดช สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

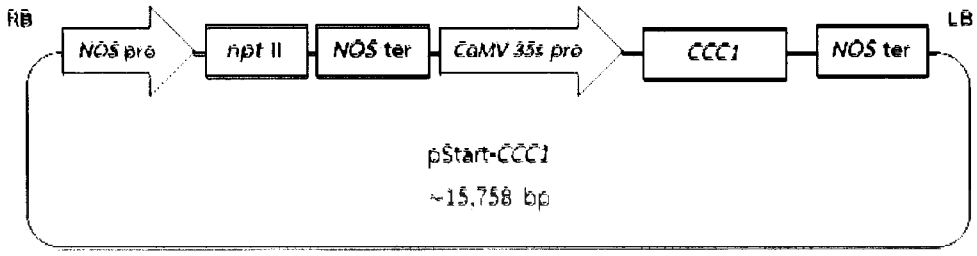
พลาสมิด (Plasmid) และยีนที่ใช้ในการทดอง

1. พลาสมิด pStart ประกอบด้วย RB, LB, *NOS* pro, *NOS* ter, *CaMV 35S*, *npt*II และ *gus* (β-glucuronidase) เป็นยีนรายงานผล (Reporter gene) ในพืช (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 พลาสมิด pStart

2. พลาสมิด pStart-*CCC1* ประกอบด้วย RB, LB, *NOS* pro, *NOS* ter, *CaMV 35S*, *npt*II และ *CCC1* (Yeast ion accumulation gene) จากดอกยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เป็น Co-pigment ยีนนี้ทำหน้าที่สะสมเหล็กในแวคิวโอต ทำให้สีน้ำเงินในดอกไม้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 พลาสมิด pStart-*CCC1*

วัสดุและอุปกรณ์

1. กระบอกตวงแบบแก้ว (Glass cylinder)
2. กระบอกตวงแบบพลาสติด (Plastic cylinder)
3. กล่องเก็บไมโครทิวบ์ (Microtube storage box)
4. กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)
5. กรรไกร (Scissors)
6. กระบอกใส่ปิเปต (Pipette can)
7. กระบอกใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish can)
8. โกร่งบดยา (Mortar and pestle)
9. ขวดรูชมพู (Erlenmeyer flask)
10. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
11. ขาดแลบฝาเกลียว (Laboratory bottle)
12. ขวดบีบน้ำกลั่น (Watch bottle)
13. ขวดพลาสติกปากกว้าง (Bottle wide mouth)
14. เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop)
15. คิวเวทท์แบบพลาสติก (Plastic cuvette)
16. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
17. ช้อนตักสาร (Spatula)
18. ดามมีด ผ่าตัด (Scalpel handle)
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์อลูมิเนียม (Alcohol burner)
20. ถุงมือยาง (Disposable gloves)
21. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
22. ที่ตั้งหลอดทดลองสแตนเลส (Rack for tube)

23. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
24. นาฬิกาจับเวลา (Digital timer)
25. ใบมีดผ่าตัด (Surgical blades)
26. บีเกอร์แบบแก้ว (Glass beaker)
27. บีเกอร์แบบพลาสติก (Plastic beaker)
28. ปิเปตแบบใช้ตรวง (Measuring pipette)
29. แปรงล้าง (Brush)
30. ปากคีบ (Forceps)
31. ผ้าปิดจมูก (Cloth mask)
32. พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)
33. พีซีอาร์ทิวป์ (PCR tube)
34. พีซีอาร์ทิวแร็ค (PCR tube rack)
35. พาราฟิล์ม (Parafilm)
36. ไมโครทิวป์แร็ค (Microtube rack)
37. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
38. ลูกยางหลอดหยด (Rubber bulb)
39. ลูกยางดูดปิเปต (Rubber for pipette)
40. สำลี (Cotton fabric)
41. หลอดทดลองแบบแก้ว (Glass test tube)
42. หลอดเซ็นตริฟิวก์ (Centrifuge tube)
43. หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
44. อลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminium foil)

เครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer: Perkin Elmer. Model Lambda 25, Germany)
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave Astell Scientific: model ASB260, England)

3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	(Incubator shaker: STUART Scientific, model SI 50, UK)
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	(Incubator shaker: SANYO GALLENKAMP PLC, model IOX400.XX2.C, UK)
5. เครื่องเขย่า	(Platform shaker: New Brunswick Scientific, model innova 2100, USA)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	(pH meter: Satorius, model PP-50, Germany)
7. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ	(Laminar air flow cabinet: Forma Scientific, model 1285, USA)
8. ตู้อบลมร้อน	(Hot air oven: BINDER, model ED115(E2), Norway)
9. ตู้บ่มเพาะเชื้อ	(Incubator: BINDER, model ED240(E2), Norway)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	(Water bath: Jolabo, model TW 20, USA)
11. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	(Balance: METTLER-TOLEDO, model PG802-S, Switzerland)
12. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	(Analytical balance: METTLER-TOLEDO, model AG285, Switzerland)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง	(Centrifuge: Kando Laboratories, model SOVALL® Biofuge pico, Germany)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ	(Centrifuge: MSE, model HARRIER18/80, UK)
15. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็ก	(Magnetic stirrer: JENWAY, model 1000, UK)
16. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	(PCR machine: MJ research, model PTC 1196 HB, USA)
17. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม	(Gel electrophoresis: Gel mate 2000, model GEP-103, Japan)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

18.	เครื่องเขย่าผสม	(Vortex: Scientific Industries, model G-560E, USA)
19.	กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ	(Stereo microscope: Olympus, model SD 3045, USA)

สารเคมี

1.	Acetic acid	(Merck, Germany)
2.	Ammonium chloride	(Merck, Germany)
3.	Agar power	(Himedia Laboratories, India)
4.	Agarose	(Nippon Gene, Japan)
5.	Ammonium nitrate	(Merck, Germany)
6.	Ammonium persulfate	(BIO-RAD, USA)
7.	Ammonium sulphate	(Ajax, Australia)
8.	Ampicillin sodium salt	(Bio basic, Canada)
9.	Acetosyringone	(Fisher, UK)
10.	N6-Benzylaminopurine	(PhytoTechnology, USA)
11.	Boric acids	(Himedia Laboratories, India)
12.	Bromophenol blue	(Fisher, UK)
13.	Bromothymol blue	(Fisher, UK)
14.	Calcium chloride dehydrate	(Ajax, Australia)
15.	Calcium phosphate tribasic	(DAEJUNG, Korea)
16.	Cetyl trimethyl ammonium bromide	(Amreso, USA)
17.	Cefotaxime	(Siam Bheasach, Thailand)
18.	Chloroform	(Lab Scan, Thailand)
19.	Cobalt (II) chloride	(Fisher, UK)
20.	Copper (II) sulphate pentahydrate	(QRëC, New Zealabd)
21.	D-glucose anhydrous	(Fisher, UK)
22.	Diaminoethanetetra-acetic acid disodium salt	(Fisher, UK)
23.	Dimethyl sulfoxide	(Merck, Germany)

24.	Ethanol	(Merck, Germany)
25.	Ethylenediaminetetra-acetic acid	(BDH, England)
26.	Glycerol	(Sigma, Germany)
27.	Glycine	(Fisher, UK)
28.	Hydrochloric acid	(Merck, Germany)
29.	Indol-3-acetic acid	(PhytoTechnology, USA)
30.	Imazalil	(Shanghai Profirst, China)
31.	Iron (II) sulphate	(Ajax, Australia)
32.	Iron (II) chloride tetrehydrate	(QRëC, New Zealabd)
33.	Isopropanol	(RIC LABSCAN, Thailand)
34.	Kanamycin sulphate	(Bio basic, Canada)
35.	L-Glutamine	(Himedia Laboratories, India)
36.	Magnesium sulfate heptahydrate	(RIC LABSCAN, Thailand)
37.	Manganese (II) sulphate monohydrate	(QRëC, New Zealabd)
38.	Methanol	(Merck, Germany)
39.	2-Mercaptoethanol	(BIO-RAD, USA)
40.	Mercury (II) chloride	(Ajax, Australia)
41.	Myo-Inositol	(Himedia Laboratories, India)
42.	Nicotinic acids	(Himedia Laboratories, India)
43.	Polyvininylpyrpolidone	(AppliChem, Germany)
44.	Potassium chloride	(Merck, Germany)
45.	Potassium acetate	(Bio basic, Canada)
46.	Potassium dihydrogen phosphate	(Merck, Germany)
47.	Potassium hexacyanoferate (III)	(QRëC, New Zealabd)
48.	Potassium hexacyanoferrate (III) trihydrate	(QRëC, New Zealabd)
49.	Potassium hydroxide	(Merck, Germany)
50.	Potassium iodide	(QRëC, New Zealabd)
51.	Potassium nitrate	(QRëC, New Zealabd)
52.	Pyridoxine hydrochloride	(Himedia Laboratories, India)
53.	Rifampicin	(Bio basic, Canada)
54.	Sodium acetate trihydrate	(Merck, Germany)

55. Sodium chloride (Merck, Germany)
56. Sodium dihydrogenphosphate (Fisher, UK)
57. Sodium dodecyl sulfate (Amreso, USA)
58. Sodium hydroxide (ACI Labscan, Thailand)
59. Sodium molybdate (Ajax, Australia)
60. Sodium molybdate dehydrate (Himedia Laboratories, India)
61. Sucrose (BDH, England)
62. Thidiazuron (Sigma, Germany)
63. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (National diagnostics, USA)
64. Thiamine hydrochloride (Himedia Laboratories, India)
65. Tryptone (Himedia Laboratories, India)
66. X-gluc (Amesco, Philippines)
67. Yeast extracts (Bio basic, Canada)
68. Zinc sulphate (RIC LABSCAN, Thailand)

ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit)

1. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Lithuania)
2. Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)
3. 2X Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO, Japan)
4. MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit (BIOLINE, UK)
5. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Lithuania)
6. DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania)
7. NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Germany)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Markers)

1. Lambda/*PstI*, ready to use (Fermentas, USA)
2. GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus, ready to use (Fermentas, USA)

เอนไซม์ (Enzyme)

1. *Pst*I (New England Biolab, USA)
2. *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)

คู่ไพร์เมอร์ (Primer)

1. CCC1_F (5'-AAA GGG ATC CAT GTC CAT TGT AGC ACT AAA-3')
2. CCC1_R (5'-AAA CGA GCT CTT AAC CCA GTA ACT TAA CAA-3')

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)
2. สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในขั้นตอนการเตรียมอาหารใช้น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละสูตรต้องปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 ปรับด้วย NaOH 1 นอร์มัล (N) หรือ HCl 1 นอร์มัล เติมวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วต้มให้วุ้นละลาย เทอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วปิดฝาให้เรียบร้อย นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที และในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟแบบฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 25±2 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ได้แก่

1. เตรียม Retarded shoots ของบุกเพื่อใช้สำหรับการส่งถ่ายยีน
   - 1.1 การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อลำต้นบุก
   - 1.2 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนลำต้นอ่อน
   - 1.3 การชักนำให้ยอดอ่อนเกิดราก

2. ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะเพื่อใช้สำหรับในการส่งถ่ายยีน
   2.1 ทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน
   2.2 ทดสอบสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อบุก
3. ทดสอบการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่บุก
   3.1 ส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่บุก
   3.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค GUS assay
4. การส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่บุก
   4.1 ส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่บุก
   4.2 ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)
      4.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของบุกที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก
      4.2.2 ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR
   4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
      4.3.1 สกัดอาร์เอ็นเอจากใบของบุกที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR
      4.3.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR
5. การนำบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกปลูกในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ แบบปิด หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองกำจัดต้นบุกโดยการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

การทดลองที่ 1 เตรียม Retarded shoots ของบุกเพื่อใช้สำหรับการส่งถ่ายยีน

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อลำต้น

นำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนของบุกมาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ผสม Tween 20 ประมาณ 1–2 หยด เป็นเวลา 10 นาที และ สารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ ผสม Tween 20 ประมาณ 1–2 หยด เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดตัวอย่างให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนสูตร อาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภพเก้า และคณะ, 2555)

1.2 ชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบุก

นำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบุกที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด ทำการวิเคราะห์ข้อมูล ทางสถิติด้วย Duncan's multiple test (ไม่มีการย้ายเนื้อเยื่อระหว่างการศึกษา)

1.3 การชักนำให้ยอดอ่อนเกิดราก

จากการนำต้นอ่อนบุกที่มีขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความ เข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทาการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วนพืช วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แล้วทำการบันทึกจำนวนรากที่เกิดขึ้น ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะเพื่อใช้สำหรับในการส่งถ่ายยีน

2.1 ทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

2.1.1 นำเนื้อเยื่อยอดอ่อน มาตัดให้ได้ขนาด 0.5 เซนติเมตร

2.1.2 นำไปวางบนอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.1.3 การทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัวอย่าง ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผล

2.2 ทดสอบสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อของบุก

2.2.1 นำเนื้อเยื่อยอดอ่อนบุก มาตัดให้ได้ขนาด 0.5 เซนติเมตร

2.2.2 นำไปว่างบนอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิต ที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 3 ตัวอย่าง ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผล

การทดลองที่ 3 ทดสอบการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ Retarded shoots ของบุก

3.1 ส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ Retarded shoots ของบุก

3.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pStart บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.1.2 จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหารแข็ง LB ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และนำเซลล์ไปวัดค่า OD_{600} ให้อยู่ในช่วง 0.3-0.5 โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.1.3 ทำการเก็บเซลล์อะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium*) โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

3.1.4 ศึกษาปริมาณ AS ที่เหมาะสม โดยทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเติม AS ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

3.1.5 ศึกษาระยะเวลาในการส่งถ่ายยีนโดยนำ Retarded shoots ขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร ที่เตรียมไว้ มาแช่ลงในสารละลายแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมที่เตรียมไว้ ทำการเขย่าร่วมกันที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 30 นาที

3.1.6 ศึกษาระยะเวลาบ่มร่วมกันของเนื้อเยื่อบุกและเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยทำการซับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วย้ายเนื้อเยื่อ Retarded shoots ไปวางบนอาหาร MS ที่เติม AS ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงร่วมกัน (Co-culture) ที่ระยะเวลา 3 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.1.7 หลังจากนั้นทำการล้างชิ้นส่วน Retarded shoots ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และล้างด้วยอาหารเหลว MS ที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

3.1.8 แล้วนำไปวางบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.1.9 ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* และบันทึกผล

3.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค GUS assay

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบุก ไปบ่มในสารละลาย X-Gluc (5-bomo-4chloro-3-indolyl gucuronide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนเมื่อได้รับยีน *gus* จะมีการแสดงออกของยีนโดยเอนไซม์ β-glucuronidase ซึ่งจะเปลี่ยนสารตั้งต้น X-Gluc ให้เป็นสารสีน้ำเงิน) หลังจากนั้นล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วสังเกตการเกิดสารสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ Retarded shoots (Jefferson et al., 1987)

การทดลองที่ 4 ส่งถ่ายยีน *CCC1*

4.1 การส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่ retarded shoots ของบุก

4.1.1 เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pSTART-*CCC1* บนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4.1.2 จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหารแข็ง LB นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และนำเซลล์ไปวัดค่า OD_{600} ให้อยู่ในช่วง 0.3-0.5 โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

4.1.3 ทำการเก็บเซลล์อะโกรแบคทีเรียมโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง

4.1.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเติม AS ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

4.1.5 นำ Retarded shoots ขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร ที่เตรียมไว้ จำนวน 100 ตัวอย่าง มาแช่ลงในสารละลายแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมที่เตรียมไว้ ทำการเขย่าร่วมกันที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.1.6 หลังจากนั้นซับเชื้อส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร MS ที่เติม AS ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4.1.7 ทำการล้างชิ้นส่วน Retarded shoots ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และล้างด้วยอาหารเหลว MS ที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.1.8 นำไปวางบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.1.9 ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.1.10 นำเนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดการยืดยาวของยอด โดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

4.1.11 หลักจากนั้นนำไปชักนำให้เกิดราก โดยคัดเลือกที่ยอดที่มีความสูงประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมNAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับธาตุเหล็ก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และนำไปตรวจสอบการส่งถ่ายยีน และการแสดงออกของยีน

4.2 ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

4.2.1 สกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากใบของบุกที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก

4.2.1.1 นำใบอ่อนของบุกที่เจริญบนอาหารคัดเลือก จำนวน 5 ตัวอย่าง และใบอ่อนบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน

4.2.1.2 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) โดยชั่งชิ้นส่วนใบบุกประมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วนำมาบดในโกร่งให้ละเอียดเป็นผงด้วยไนโตรเจนเหลว

4.2.1.3 เติม CTAB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมโพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone, PVP) ความเข้มข้น 1.0 กรัม และ 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดเซนติฟิว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4.2.1.4 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.2.1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

4.2.1.6 แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดเซนติฟิวหลอดใหม่ เติม ฟีนอล:คลอโรฟอร์ม 1:1 (Phenol:Chloroform, 1:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4.2.1.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่

4.2.1.8 แล้วเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตรต (3 M Sodium acetate) pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติม 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (100% Ethanol) เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน

4.2.1.9 นำไปเก็บที่ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือทิ้งข้างคืน

4.2.1.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4.2.1.11 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.2.1.12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เท ส่วนใสทิ้ง (ล้างตะกอนจำนวน 2 ครั้ง)

4.2.1.12 ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง โดยตากตะกอนดีเอ็นเอไว้บนกระดาษทิชชู ประมาณ 15 นาที

4.2.1.13 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer จากนั้นเติม RNase A (10 ยูนิต/มิลลิลิตร) แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.2.1.14 หลังจากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพ และขนาดด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis) ใช้อากาโรส (Agarose) 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที

4.2.1.15 จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)

4.2.2 ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

4.2.2.1 ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *CCC1* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน คือ CCC1_F กับ CCC1_R ตามลำดับ เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยารวม (Reaction mixture) ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA) 100 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 1x Quick *Taq* HS DyeMix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, 0.2 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 23 ไมโครลิตร

4.2.2.2 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง MyGeneTM Series Peltier Thermal cycler (LongGene, Hangzhou) มีเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้ เริ่มจาก Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ต่อด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่ Annealing ที่อุณหภูมิ 55 *CCC1* องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่ Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 10 นาที

4.2.2.3 แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้อากาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที

4.2.2.4 จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR

4.3.1 สกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากใบของบุกที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

4.3.1.1 นำใบอ่อนของบุกที่ได้รับยีน *CCC1* ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR แล้ว นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ตัวอย่างใบประมาณ 100 มิลลิกรัม มาบดในโกร่งให้ละเอียดเป็นผงด้วยไนโตรเจนเหลว

4.3.1.2 นำตัวอย่างที่บดเสร็จใส่ในหลอดเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติมสารละลาย E-RED™ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องวอร์เทค (Vortex) ที่อุณหภูมิห้อง (15-30 องศาเซลเซียส)

4.3.1.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

4.3.1.4 เสร็จแล้วเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง

4.3.1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.3.1.6 ดูดส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอน (Supernatant) ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวหลอดใหม่ และเติม ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 5-6 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

4.3.1.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และค่อยๆ เทใสที่อยู่เหนือตะกอนทิ้ง

4.3.1.8 ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการเติม 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 4-5 ครั้ง

4.3.1.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และค่อยๆ เทใสที่อยู่เหนือตะกอนทิ้ง

4.3.1.10 ทำการตากตะกอนอาร์เอ็นเอบนกระดาษทิชชู 10 นาที และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร

4.3.1.11 หลังจากนั้นนำสารละลายอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพขนาดด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้อากาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที

4.2.1.12 จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

4.3.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

4.3.2.1 นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ความเข้มข้น 0.1 นาโนกรัม ถึง 5 ไมโครกรัม ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์

4.3.2.2 เติมไพรเมอร์ Oligo $(dT)_{18}$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายได้ 12 ไมโครลิตร

4.3.2.3 สปินดาวน์ (Spin down) นำไปใส่เครื่อง PCR ตั้งโปรแกรมไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.3.2.4 เสร็จแล้วเติม 5X reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLockTM RNase Inhibitor (20 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase (200 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

4.3.2.5 สปินดาวน์ นำไปใส่เครื่อง PCR ตั้งโปรแกรมไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (ขั้นตอนนี้เป็นการทำ cDNA จากอาร์เอ็นเอ)

4.3.2.6 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *CCC1* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน คือ CCC1_F กับ CCC1_R เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยารวม ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย cDNA 100 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 1x Quick *Taq* HS DyeMix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, 0.2 uM ไพรเมอร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 23 ไมโครลิตร

4.3.2.7 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR มีเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้ เริ่มจาก Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ต่อด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่ Annealing ที่อุณหภูมิ 55 สำหรับ CCC1 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่ Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 10 นาที

4.3.2.8 แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ใช้อากาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที

4.3.2.9 จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

การทดลองที่ 5 ตรวจสอบการดูดซับธาตุโลหะหนัก

5.1 ทำการตัดใบของบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมธาตุเหล็ก

(Fe) ส่งไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณธาตุเหล็ก (Fe) ที่ห้องปฏิบัติการ หลักสูตรปฐพีศาสตร์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การทดลองที่ 6 นำต้นบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกปลูก

6.1 นำต้นอ่อนบุกที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมมาปรับสภาพในอุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูก

6.2 หลังจากนั้นทำการล้างน้ำเพื่อกำจัดวุ้นออกแล้วนำมาปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วย ทราย: ขุยมะพร้าว: ถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำให้ชุ่ม

6.3 แล้วเอาใส่ในถุงพลาสติก เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มกราคม 2559 – ธันวาคม 2560

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุกเพื่อใช้สำหรับการส่งถ่ายยีน

1. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากลำต้นอ่อนบุก

จากการนำชิ้นส่วนของลำต้นอ่อนบุกที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงสูตรบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร(N=100) พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบุกที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบุกจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนลำต้นอ่อนบุกที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.2, 1.2 และ 0.4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชตามลำดับ และสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด จำนวนยอดเฉลี่ย 4.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 1, ภาพที่ 10)

ตารางที่ 1 ผลของ BA ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากลำต้นอ่อนบุก

BA (mg/l)	Shoot formation (%)	Mean of retarded shoot per Explants (Shoot)
0	0	0.00 ± 0.00^{d}
1	100	4.60 ± 0.54^{a}
2	100	2.20 ± 0.37^{b}
3	80	1.20 ± 0.37^{cd}
4	40	0.40 ± 0.24^{d}

หมายเหตุ ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests



ภาพที่ 10 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้นอ่อนบุก

หมายเหตุ โดยที่ ก คือ ลำต้นอ่อนบุกเลี้ยงบนอาหาร MS, ข คือ ลำต้นอ่อนบุกที่เลี้ยงบนอาหาร MS+BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ค คือ ลำต้นอ่อนบุกที่เลี้ยงบนอาหาร MS+BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ศึกษาการชักนำให้ยอดอ่อนบุกเกิดราก

จากการนำยอดอ่อนบุกที่มีขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรMS ทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (N=100) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยมีจำนวนรากเฉลี่ย 0.2, 1.8, 0.8 และ 0.2 รากต่อยอด สำหรับสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 3.2 รากต่อยอด (ตารางที่ 2, ภาพที่ 11)

ตารางที่ 2 ผลของ NAA ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนบุก

NAA (mg/l)	Roots formation (%)	Mean of root per shoot (root)
0	20	0.20±0.20 [i]
0.1	100	3.20±0.37 [j]
0.2	100	1.80±0.37 [k]
0.3	60	0.80±0.37 [l]
0.4	20	0.20±0.20 [l]

หมายเหตุ ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests



ภาพที่ 11 การการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนบุก

หมายเหตุ โดยที่ ก คือ ยอดอ่อนบุกเลี้ยงบนอาหาร MS, ข คือ ลำต้นอ่อนบุกที่เลี้ยงบนอาหาร MS+NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะเพื่อใช้สำหรับในการส่งถ่ายยีน

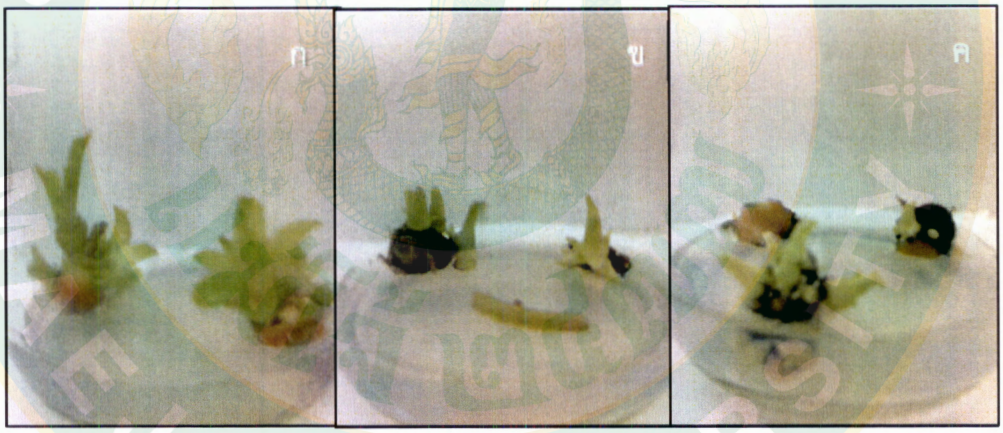
1. ทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายส่งยีนเข้าสู่บุก ที่มียีน *npt*II (Neomycin phosphotransferase) ซึ่งควบคุมลักษณะที่มีการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นให้ได้ขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตรนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกานามัยซิน ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินสามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาอย่างเป็นปกติ และเนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว (ภาพที่ 12 ก) ส่วนเนื้อเยื่อลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อยังคงมีการสร้างยอดใหม่เกิดขึ้นแต่มีจำนวนลง (ภาพที่ 12 ข) ส่วนเนื้อเยื่อลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้ แต่เนื้อเยื่อกลายเป็นสีขาวเหลือง จากนั้นจะเจริญขึ้นมาเป็นต้นสีขาวที่มีความผิดปกติ และตายในระยะเวลาต่อมา (ภาพที่ 12 ค) ดังนั้นงานวิจัยจึงเลือกใช้สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เนื้อเยื่อไม่สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้ มาใช้ในการส่งถ่ายยีน การใช้สารปฏิชีวนะกานามัยซินมาการคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนในแต่ละพืชมีความแตกต่างกัน กัญจนา และสุเมธ (2551) โดยสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรีย และใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยยีน *npt* II แยกได้จากแบคทีเรีย Tn5 มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ Neomycin phosphotransferase II มีผลยับยั้งการทำงานของ Aminoglycoside antibiotic ได้ด้วยกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) ตัวอย่างของ Aminoglycoside antibiotic ได้แก่สารปฏิชีวนะ กานามัยซิน, เจนตามัยซิน (Gentamicin) และพาโรโมมัยซิน (Paromomycin) ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อการสร้างโปรตีนโดยจะเกาะกับ 30S ribosomal subunit จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถถอดรหัส และแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนได้ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (สุมนทิพย์, 2540)

ตารางที่ 3 ผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายส่งยีน

MS+BA 1+กานามัยซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช
0	4.60±0.54[a]
25	2.20±0.37[b]
50	0.80±0.37
75	0.00±0.00
100	0.00±0.00

หมายเหตุ ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ±SE ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests



ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

หมายเหตุ โดยที่ ก คือชุดควบคุม ข คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ค คือ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ทดสอบสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมที่มีต่อการเจริญเติบโตของบุก

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมที่ใช้เป็นสารกำจัดเชื้อแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียม โดยทำการตัดลำต้นให้ได้ความยาว 0.5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อลำต้นบุกที่-

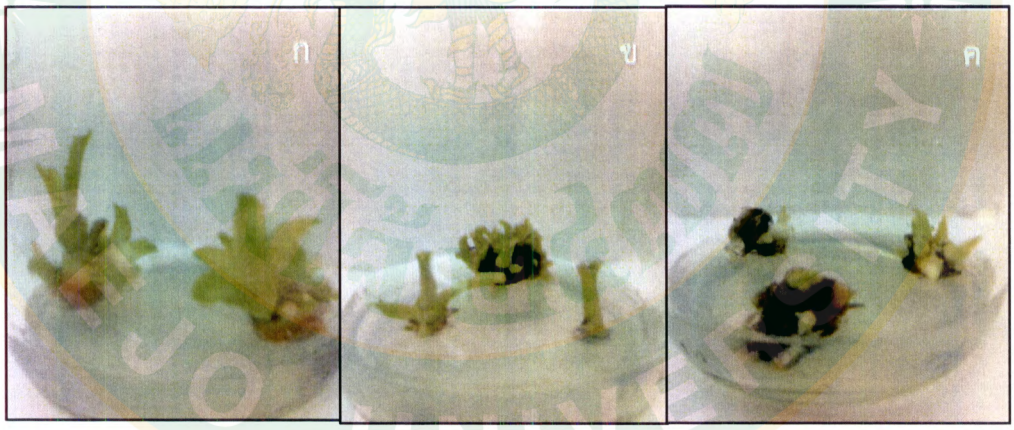
เลี้ยงบนสูตรอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม เนื้อเยื่อสามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาอย่างเป็นปกติ และเนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 4, ภาพที่ 13 ก) เนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อยังสามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นได้แต่มีจำนวนลดลง และเนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.8, 1.6, 1.5 และ 1.2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ (ตารางที่-4, ภาพที่ 13 ข) ส่วนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อยังสามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้แต่มีจำนวนยอดที่ลดลงมาก โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.8 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ภาพที่ 13 ค) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อเนื้อเยื่อน้อยที่สุด

เซฟโฟแทกซิมเป็นสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมออกจากเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยเซฟโฟแทกซิมจะเข้าไปจับกับเอนไซม์ Peptiglycan transpeptidase ทำให้ไม่มีการเชื่อมต่อของสาย Peptidoglycan จึงมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งกลไกดังกล่าวไม่มีผลต่อเซลล์พืช มีรายงานการใช้เซฟโฟแทกซิมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดมีผลกระทบต่อการเจริญของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน โดยอาจส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอด กระตุ้นการเกิดยอด หรือแคลลัส และยับยั้งการเกิดยอดได้ (สุมนทิพย์, 2540) จากการศึกษาพบว่าสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เนื่องจากมีการสร้างจำยอดมากกว่าสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abdullah et al. (2005) พบว่าสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่จะนำมาใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินในการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม แต่ละความเข้มข้นที่นำมาใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ที่จะนำมาใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และชนิดของเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของบุก

MS++เซฟโฟแทกซิม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช
0	4.60±0.54[a]
100	1.80±0.37[c]
150	1.60±0.24[d]
200	1.50±0.32[d]
250	1.20±0.37[de]
300	0.80±0.58[e]

หมายเหตุ ตัวเลข คือค่าเฉลี่ย ±SE ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests



ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเซฟโฟแท็กซิม

หมายเหตุ โดยที่ ก คือชุดควบคุม ข คือ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ค คือ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

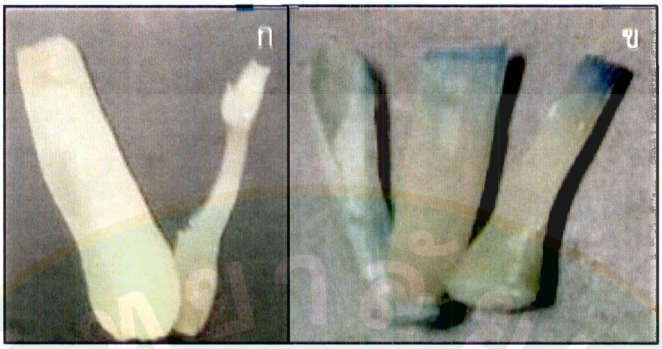
3. ทดสอบการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่บุก

การทดสอบการส่งถ่ายพลาสมิด pStart ซึ่งมียีน *npt* II เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิดโดย

การใช้เชื้อ *A. tumefacience* สายพันธุ์ LBA4404 พบว่าเนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุกที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อผ่านไป 6 สัปดาห์ เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุกเริ่มมีการแตกยอดใหม่เกิดขึ้น แสดงว่ายีน *npt* II ได้ถูกส่งเข้าไปในเนื้อเยื่อ Retarded shoots และมีการแสดงออก เนื่องจาก ยีน *npt* II เป็นยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้จะสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ (Wilmink and Dons, 1993) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS asassy โดยใช้เนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pStart เกิดสีน้ำเงิน ส่วนเนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่มีการเกิดสีน้ำเงิน จากการคำนวณประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุกโดยคำนวณจากการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า ประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pStart ด้วยเชื้อ *A. tumefacience* สายพันธุ์ LBA4404 เท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) แสดงว่ายีน *gus* ได้ถูกส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อ rtarded shoots และมีการแสดงออก เนื่องจากผลผลิตของยีน *gus* คือ β-blucuronidase ได้เปลี่ยนสารตั้งต้น X-gluc ให้เป็นสารสีน้ำเงิน (Jefferson et al., 1987) ซึ่งเมื่อสังเกตจากตาเปล่าจะพบว่า การเกิดสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่ผ่านการส่งถ่ายด้วย พลาสมิด pStart จะมีสีเข้ม (ภาพที่ 14 ก และ ข) เนื่องจากพลาสมิด pStart เป็นพลาสมิดที่ดัดแปลงมาจากพลาสมิด pBI121 โดยการเติม poly CAA และ CT motif บริเวณ 5'UTR ที่อยู่บริเวณหน้ายีน *gus* ซึ่งจะทำให้ยีน *gus* มีการแสดงออกมากขึ้น (Francesca et al., 2007)

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู้ Retarded shoots ของบุก

จำนวน Retarded shoots	การแสดงออกของยีน *gus*	ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน
100 ตัวอย่าง	11 ตัวอย่าง	11 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 14 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus*

หมายเหตุ โดยที่ ก คือชุดควบคุม และ ข คือการแสดงออกของยีน *gus* ส่งผลให้เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ

ส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่บุก

1. ส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุก

จากการส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่เนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุก โดยเทคนิค *Agrobacterium*-mediated Transformation ซึ่งได้ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 50 ชิ้น ทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีเนื้อเยื่อ Retarded shoots สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกจำนวน 5 ชิ้น คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 10 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อ Retarded shoots ทั้ง 5 ชิ้นถูกชักนำให้เกิดการยืดยาวบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ นำมาชักนำให้เกิดรากบนอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 15) นำมาตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR และเตรียมนำออกทดลองปลูก



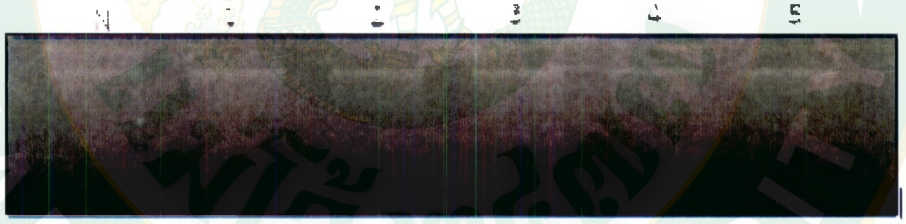
ภาพที่ 15 เนื้อเยื่อ Retarded shoots ที่ได้รับยีน *CCC1* สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก

จากการส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่ Retarded shoots ของบุก โดยอาศัยเชื้อ *A. tumefacience* สายพันธุ์ LBA4404 เป็นพาหะ พบว่าเนื้อเยื่อ Retarded shoots ของบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถเจริญได้ในบนอาหารคัดเลือก แสดงว่ายีน *npt* II ได้ถูกส่งเข้าไปใน Retarded shoots มีการแสดงออก เนื่องจากยีน *nptII* เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน เนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้จะสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกที่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ (Wilmink and Dons, 1993) ส่วน Retarded shoots ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนจะมีการชะงักการเจริญเติบโต และเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล และตาย เนื่องจากสารปฏิชีวนะกานามัยซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโตคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ โดยไปเกาะกับ 30S ribosome subunit ทำให้ยับยั้งการแปลรหัสเป็นโปรตีนซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อ Retarded shoots เป็นสีขาวเพราะไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ได้ (Wilmink and Jons, 1993) จากการศึกษาการขนส่งสารปฏิชีวนะกานามัยซินในเนื้อเยื่อของพืช พบว่าสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ไม่ได้เคลื่อนที่ในเนื้อเยื่อลำเลียงแต่จะแพร่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งพบว่าจะมีการเคลื่อนที่แค่ระยะทางสั้นๆ (Weide et al., 1989) ถ้าชิ้นส่วนพืชขนาดใหญ่จะทำให้สารปฏิชีวนะกานามัยซินเคลื่อนที่ไปไม่ถึง โดยมีการศึกษาการส่งถ่ายยีนเนื้อเยื่อปลายยอดของทิวลิปพบว่าการใช้สารปฏิชีวนะกานามัยซินคัดเลือกจะมีประสิทธิภาพได้ดีเมื่อใช้เนื้อเยื่อปลายยอดขนาดเล็กในการส่งถ่ายยีน (Wilmink and Dons, 1993)

2. การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

2.1 สกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากใบอ่อนบุกที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก

นำใบอ่อนบุก *CCC1* ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) โดยใช้วิธี CTAB แล้วนำมาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทโพริซีส โดยการย้อมด้วยสารละลาย เอธิเดียมโบมาย พบว่าจีโนมมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เห็นจีโนมมิกดีเอ็นเอเป็นแถบเข้มอย่างชัดเจนแสดงว่ามีคุณภาพดี แต่จะมีการแตกหักของจีโนมมิกดีเอ็นเอบางส่วน สังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นปื้น (Smear) และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR ต่อไปได้ (ภาพที่ 16) การสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) เป็นวิธีที่นิยมใช้เพราะได้จีโนมมิกดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ และได้ความเข้มข้นของจีโนมมิกดีเอ็นเอในปริมาณที่มาก เนื่องจากสาร CTAB ซึ่งเป็นสาร Cationic detergent จะจับกับดีเอ็นเออยู่ในรูปของ CTAB-DNA complex ที่ละลายได้ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง สามารถแยกจีโนมมิกดีเอ็นเอออกมาได้โดยการลดความเข้มข้นของเกลือในสารละลายให้น้อยลง หรือตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (สุรินทร์, 2552)



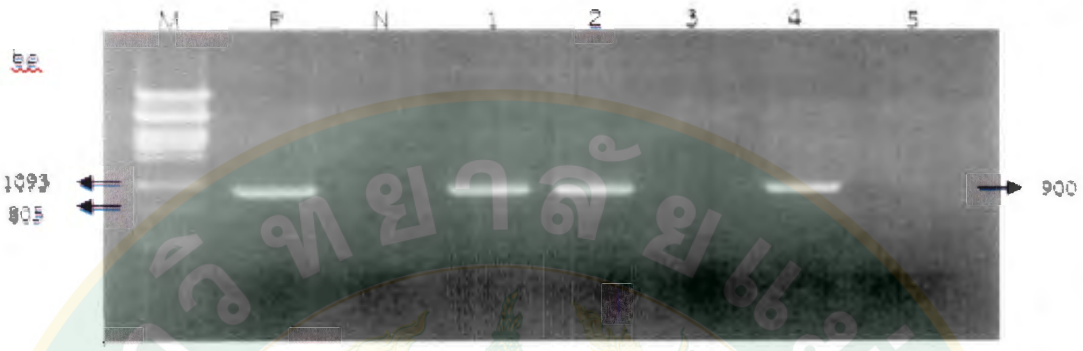
ภาพที่ 16 การสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

หมายเหตุ โดยที่ N คือ บุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน 1-5 คือ บุกที่ได้รับยีน *CCC1*

2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

จากการนำจีโนมมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนบุกทั้งหมด 6 ตัวอย่างที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *CCC1* และจีโนมมิกดีเอ็นเอของใบอ่อนบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจการสอดแทรกของยีนโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *CCC1* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CCC1_F และ CCC1_R ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *CCC1* พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของใบอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *CCC1* เมื่อตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทโพริซีส พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 900 คู่เบส จำนวน 3 ตัวอย่าง จาก 5 ตัวอย่าง ภายในใบของบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพลาสมิด pStart-*CCC1* แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปสู่บุกในขณะที่ใบอ่อนของบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอนี้ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การตรวจสอบการส่งถ่ายยีน *CCC1* ด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ โดยที่ M คือ marker lamda/*Pst* I, P คือ Positive control (pStart-*CCC1*), N คือ Negative control (บุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน) และ 1-5 คือบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *CCC1*

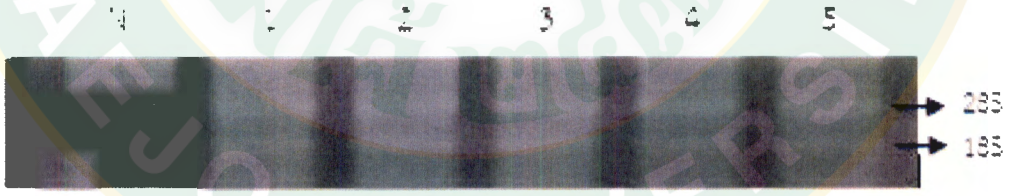
โดยเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบการส่งถ่ายยีน โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนที่จะทำการตรวจสอบ โดยเทคนิค PCR มีการใช้ในการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในพืชกันเป็นจำนวนมาก เช่น ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในปทุมมา แวว มยุรา พิทูเนีย (Mahadtanapuk et al., 2006; Michalczuk and Wawrzynczak, 2004; Ono et al., 2006) เป็นต้น

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR

3.1 สกัด RNA จากใบอ่อนบุกที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

นำใบอ่อนของบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *CCC1* มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ Easy-RED™ พบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวขุ่น ละลายน้ำได้ง่าย เมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทโพริซีส พบว่าลักษณะแถบของอาร์เอ็นเอเกิดขึ้นมีความคมชัดทั้ง 2 แถบ ซึ่งเป็น อาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ขนาด 28s และ 18s (ภาพที่ 18) อย่างไรก็ตามแถบอาร์เอ็นเอที่ได้ในแต่ละตัวอย่างมีความสว่างไม่เท่ากัน แสดงถึงความเข้มข้นที่ต่างกัน ในการสกัดอาร์เอ็นเอใช้ตัวอย่างพืชประมาณ 0.2 กรัม ตะกอนอาร์เอ็นเอละลายในน้ำปริมาณ 30 ไมโครลิตร การใช้ Easy-RED™ ในการสกัดอาร์เอ็นเอเป็นวิธีการสกัดแบบ Single step ซึ่งแยกอาร์เอ็นเอออกจากจีโนมมิก

ดีเอ็นเอ หลังจากที่สกัดด้วย Easy-RED™ และเติม Chloroform แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง สารละลายที่ได้เกิดการแยกชั้น โดยที่สารละลายอาร์เอ็นเอจะแยกอยู่ชั้นบน ส่วนจีโนมมิกดีเอ็นเอ และโปรตีนจะอยู่ในสารละลายชั้นล่าง จากนั้นจึงแยกสารละลายชั้นที่มีอาร์เอ็นเอออกจากจีโนมมิกดีเอ็นเอและโปรตีน ตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วย Isopropanol (Chomozynski and Sacchi, 2006) การใช้ Easy-RED™ ในการสกัดอาร์เอ็นเอคือหลังจากที่นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกสารละลายอาร์เอ็นเอสารละลายที่ได้แยกชั้นไม่ชัดเจน (Ding et al., 2008) ในการทดลองใช้วิธีการนี้สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนใบอ่อนของปทุมมากระถาง พบการปนเปื้อนของจีโนมมิกดีเอ็นเอเกิดขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากในระหว่างที่มีการแยกสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นสารละลายของอาร์เอ็นเอมีการปนเปื้อนของสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นส่วนของจีโนมมิกดีเอ็นเอ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของจีโนมมิกดีเอ็นเอ และสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโทโพริซีส การใช้ Easy-RED™ พบการปนเปื้อนของจีโนมมิกดีเอ็นเอในปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับวิธีการอื่น (Portillo et al., 2006) แต่ยังต้องกำจัด จีโนมมิกดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ *DNase*I เนื่องจากอาจส่งผลต่อการทำปฏิกิริยา PCR และการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในภายหลัง (Dunican et al., 1997) คือผลผลิต PCR ไม่ได้มาจาก cDNA เป้าหมายที่ต้องการ แต่เป็นการเพิ่มปริมาณจีโนมมิกดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน เนื่องจากมีลำดับเบสเหมือนกัน (Lingerfelt et al., 2009) เมื่อได้ RNA ที่มีคุณภาพ ไม่มีการปนเปื้อนของจีโนมมิกดีเอ็นเอสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ต่อไป



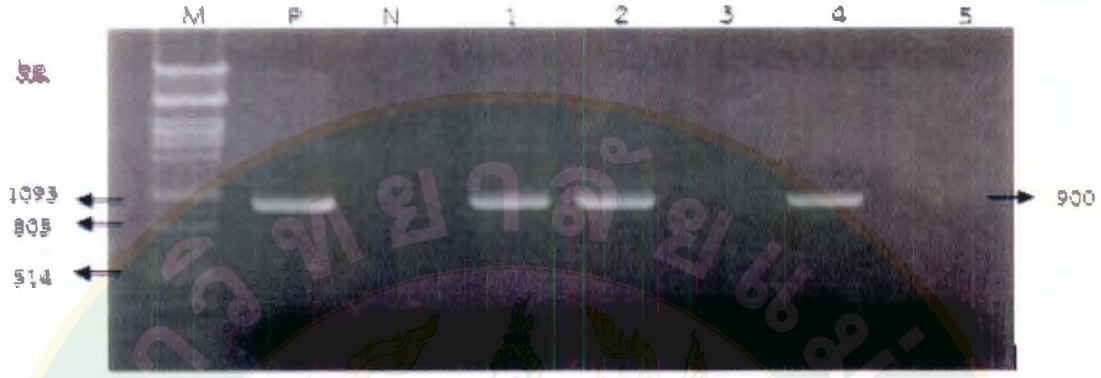
ภาพที่ 18 การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

หมายเหตุ โดยที่ N คือ บุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน 1-5 คือ บุกที่ได้รับยีน *CCC1*

3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการนำอาร์เอ็นเอจำนวน 6 ตัวอย่าง ที่สกัดจากใบอ่อนของบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *CCC1* และอาร์เอ็นเอของบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CCC1_F และ CCC1_R ที่มี

ความจำเพาะเจาะจงกับยีน *CCC1* พบแถบดีเอ็นเอ 3 ตัวอย่าง ของยีน *CCC1* มีขนาด 900 คู่เบส ในบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และไม่พบแถบดีเอ็นเอในบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCC1* ด้วยเทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ โดยที่ M คือ marker lamda/*Pst* I, P คือ Positive control (pStart-*CCC1*), N คือ Negative control (บุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน) และ 1-5 คือบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *CCC1*

โปรโมเตอร์เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป ซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์ RNA polymerase เข้ามาเกาะ และเริ่มการถอดรหัสเพื่อสร้าง mRNA โปรโมเตอร์จะอยู่ในส่วนของ Non-transcribed DNA ที่อยู่ทางด้าน Upstream ของจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนอาจเป็นชนิดที่แสดงออกตลอดเวลาในเนื้อเยื่อทุกชนิด (Constitutive promoter) หรือแสดงออกในเนื้อเยื่อใดเนื้อเยื่อหนึ่ง (Tissue/Organ specific promoter) หรืออาจเป็นโปรโมเตอร์ที่จะแสดงออกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม (Inducible promoter) ส่วนในงานวิจัยใช้โปรโมเตอร์ *CaMV 35s* ที่ควบคุมการแสดงออกของ *CCC1* เป็นโปรโมเตอร์จากไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคใบด่างของดอกกะหล่ำ (Cauliflower mosaic virus) (สุรินทร์, 2548) มีคุณสมบัติที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้ในการส่งถ่ายยีน เช่น ถั่วเหลือง (Christou et al.,1988) มะเขือเทศ (Sheehy et al., 1988) มันฝรั่ง (Sheerman and Bevan, 1988) เป็นต้น โดยเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในพืชรุ่นแรก (R_0) ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน คือ RT-PCR (Liao et al., 2004)

ตรวจสอบการดูดซับธาตุโลหะหนัก

จากการนำบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมธาตุเหล็ก (Fe) และส่งตรวจสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็ก (Fe) พบว่า บุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถดูดซับธาตุเหล็กได้ดีกว่าบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ดังตาราง

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็กในบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

ตัวอย่างบุก	Total form (ppm) เหล็ก (Fe)	Total form (%) เหล็ก (Fe)
N	718	0.07
1	14,343	1.43
2	15,494	1.55
4	15,324	1.53

หมายเหตุ N คือ บุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน, หมายเลข 1, 2, และ 4 คือ บุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีน*CCC1*

การนำต้นอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกปลูก

จากการนำต้นอ่อนบุกที่เกิดรากออกปลูก โดยวัสดุเพาะปลูกที่ประกอบด้วยดินร่วน ทราย และขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนบุกมีการเจริญเติบโตขึ้น สังเกตพบการแตกใบและรากใหม่ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 การนำต้นอ่อนบุกออกปลูก

หมายเหตุ โดยที่ ก คือ ต้นอ่อนบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนเลี้ยงบนอาหาร MS, ข คือ ลำต้นอ่อนบุกที่ย้ายออกปลูก

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุก โดยเริ่มจากการชักนำให้เกิดยอดจากลำต้นอ่อนบุกบนอาหาร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด จำนวนยอดเฉลี่ย 4.6 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และ จากการศึกษาการชักนำรากจากยอด พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 3.2 รากต่อยอด จากนั้นศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินโดยสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกบุกหลังจากที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abdullah et al. (2005) พบว่าสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่จะนำมาใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินในการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.)

ผลการทดสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pStart ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ระยะเวลาในการเขย่าร่วมกันเป็นเวลา 30 นาที ในอาหารเหลว MS ที่เติม AS ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ บ่มร่วมกันในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อของบุก เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* มีจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อ โดยมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการส่งถ่ายยีน *CCC1* เข้าสู่เนื้อเยื่อลำต้นอ่อนบุก ด้วยเทคนิค *Agrobacterium*-mediated Transformation ซึ่งได้ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 100 ชิ้น ทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MSที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีเนื้อเยื่อบุกมีอัตราการรอดชีวิต 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลตรวจสอบการส่งถ่ายยีน *CCC1* ของบุก 6 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนแต่ละตัว พบว่ามีการแทรกของยีนในจีโนมพืช และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR

พบการแสดงออกของยีน 3ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ

จากการนำบุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมธาตุเหล็ก (Fe) และส่งตรวจสอบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็ก (Fe) พบว่า บุกที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถดูดซับธาตุเหล็กได้ดีกว่าบุกที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน

ข้อเสนอแนะ

จากการส่งถ่ายยีน *CCC1* ที่เกี่ยวข้องกับการธาตุโลหะ สามารถดูดซับธาตุโลหะได้จริง แสดงว่ายีนที่ส่งถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดลองกับธาตุเพียงชนิดเดียว ดังนั้นในอนาคตควรมีการศึกษาธาตุโลหะตัวอื่นร่วมด้วย เพื่อยืนยันการทำงานของยีนที่มีประสิทธิภาพ รวมไปถึงการศึกษาในพืชต่างชนิดกันออกไปเพื่อปรับใช้ให้ตรงกับการแก้ปัญหาในแต่ละส่วน และในปัจจุบันในหลายๆประเทศที่มีการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมมักจะประสบปัญหาการปนเปื้อนสารพิษโลหะหนักในดิน มลพิษเหล่านี้ก่อให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศ เช่น น้ำใต้ดิน สัตว์ พืช รวมถึงมนุษย์ เนื่องจากมลพิษเหล่านี้ มีความสามารถในการย่อยสลายต่ำ จึงก่อให้เกิดการสะสมและตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งในอนาคตอาจมีการนำพืชที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมนี้มาใช้เพื่อแก้ปัญหาที่พบเหล่านี้ได้

บรรณานุกรม

กษิดิฐ ดิษฐบรรจง. 2544. **การสร้างสิ่งมีชีวิต (พืช) ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ. 2551. การส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**, 39(3), 211-214.

กรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์. 2548. **เอกสารวิชาการระดับเกณฑ์พื้นฐานของการปนเปื้อนของโลหะหนักในดิน.** กรุงเทพฯ: กรมวิชาการ.

เกศณี มณีกาศ. 2546. **การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยการใช้ mini-binary vector.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จรัล เห็นพิทักษ์. 2534. **ผลของอินทรีย์วัตถุต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตหัวใต้ดินของบุกไข่.** ปัญหาพิเศษปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงกมล คำสอน และ ชมพูนุท ไชยรักษ์. 2556. การดึงดูดโลหะหนักของทานตะวันที่ปลูกในดินปนเปื้อน สังกะสี ตะกั่ว และทองแดง. **วารสารวิทยาศาสตร์ขอนแก่น**, 41(2), 468-475

ทวีพงศ์ สุวรรณโร. 2528. **การขยายพันธุ์บุกโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทิพวัลย์ สุกุมลนันทน์ และ จเร สดากร. 2545. รวบรวมและศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของบุกในภาคเหนือ. น. 171-172. ใน **รายงานการประชุมวิชาการกองพฤกษศาสตร์และวัชพืช** "พฤกษศาสตร์และวัชพืช ยุคคิดใหม่ ทำใหม่" 15-17 พฤษภาคม 2545 ณ โรงแรมพาวิลเลียนริมแควรีสอร์ท จังหวัดกาญจนบุรี.

สมุนไพรพืชเศรษฐกิจ. 2533. **จุลสารข้อมูลสมุนไพร,** 7, 10-17.

นพมณี โทปุญญานนท์. 2545. **การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** เชียงใหม่: สำนักพิมพ์ iBeam Press Studio.

พินิจดา สุระจิตร์ และ ฉันทนา สุวรรณธาดา. 2543. การขยายพันธุ์ว่านแสงอาทิตย์โดยวิธีการผ่าหัว. **วารสารเกษตร**, 16, 236-241.

มงคล เกษประเสริฐ. 2547. **บุกและการใช้ประโยชน์จากบุกในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, กาญจนรี พงษ์ฉวี และวรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. ม.ป.ป. **การขยายพันธุ์พลับพลึงธาร Cinum thaianum Schulze.** กรุงเทพฯ: กลุ่มงานวิจัยพรรณไม้น้ำ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

ศิริทิพย์ โชคนาชัย. 2546. **การศึกษาพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์บุกโดยใช้สารโคลชิซิน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2540. **เทคโนโลยีการส่งถ่ายจีนสู่พืชชั้นสูง.** ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2548. **การถ่ายฝากยีนในพืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

_____. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หรรษา จักรพันธุ์ ณ อยุธยา. 2531. บุก (พืช). **กสิกร,** 61, 505-508.

หรรษา จักรพันธ์ ณ อยุธยา และ อรนุช เกษประเสริฐ. 2532. **พืชสมุนไพร.** เอกสารวิชาการเล่มที่ 1 งานวิจัยพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ. กรุงเทพฯ: กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร.

อดิศักดิ์ เอกสุสรรณ. 2538. แป้งบุก การผลิต สมบัติบางประการ และการนำไปใช้ประโยชน์. **วารสารอาหาร,** 25, 238-242.

Abdullah, R., Zainal, A., Heng, W. Y., Li, L. C., Beng, Y. C., Phing, L. M., Sirajuddin, S. A., Ping, W. Y. S. & 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.

Alluri, H. K. et al. 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. **African Journal ofBiotechnology,** 6(25), 2924-2931.

Angenon, G., Dillen, W. & Montagu, M. V. 1994. Antibiotic resistance markers for plant transformation. **Plant Mol. Biol. Manual,** 1, 1-13.

Antanaitis, D. & Antanaitis, A. 2014. Migration of heavy metals in soil and their concentration in sewage and sewage sludge. **EKOLOGIJA,** 1, 42-45.

Brown, D. 2000. **Aroid, Plant of the Arum Family.** Porland, Oregon: Timberpress,

Christou, P., McCabe, D. E. & Swain, W. F. 1988. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. **Plant Physiology,** 87(67), 1-74.

Chyi, Y. & Phillips, G. C. 1987. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on condition favorable for regeneration. **Plant Cell Reports,** 6, 105-108.

Chomozynski, P. & Sacchi, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chlorofrom extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols,** 1, 581-585.

Ding, L. W., Sun, Q. Y., Wang, Z. Y., Sun, Y. B. & Xu, Z. F. 2008. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. **Analytical Biochemistry,** 374, 426-428.

Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus,** 12, 13-15.

Dunican, D., Parle-McDermott, A. & Croke, D. T. 1997. Gene expression profiling of cells and tissues. **Current Diagnostic Pathology,** 4, 170-175.

Francesca, D. M., Patti, T. & Marchetti, S. 2007. Improvement of the pBI121 plant expression vector by leader replacement with a sequence combining a poly (CAA) and a CT motif. **Transgenic Research,** 16, 731-738.

Follett, J. M. & Douglas J. A. 2002. Konjac production in Japan and potential for New Zealand. **Combined Proceedings International Plant Propagators' Society,** 52, 186-190.

Hetterscheid, W. L. A. 1994. Preliminary taxnomy and morphology of *Amorphophallus* Blume ex Decaisne (Araceae). pp. 35-48. In Serebryanyi, M. M. (ed.). **Proc. Moscow Aroid Confernce.**

Hetterscheid, W. L. A. & ttenbach S. I. 1996. Everything you always wanted to know about Amorphophallus but were afraid to stick your nose into. **Arodeana,** 19, 7-129.

Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. & Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **J. Bacteriol.,** 168, 1291-1301.

Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F. & Fry, J. 2003. *Agrobacterium* mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. **Plant Cell Rep,** 21, 1010-1019.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. 1987. GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO. J.,** 6,-3901-3907.

Kahl, G., Oba, K., Furuta, M. & Uritani, L. 1982. Wounding-induced enhancement of the activity of chromatin and DNA-dependent RNA polymerases in sweet potato root. **Agricultural and Biological Chemistry,** 46, 2457-2463.

Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. & Kumashiro, T. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant J.,** 10, 165-174.

Liao, L. J., Pan, I. C., Chan, Y. L., Hsu, Y. H., Chen, W. H. & Chan, M. T. 2004. Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of Cymbidium Mosaic Virus is a manifestation of RNA-mediated. **Molecular breeding,** 13, 229-242.

Lingerfelt, M. A., Fox, G. E. & Willson, R. C. 2009. Reduction of DNA contamination in RNA samples for reverse transcription-polymerase chain reaction using selective precipitation by compaction agents. **Analytical,** 384, 79-85.

Mahadtanapuk, S., Topoonyanont, N. & Handa, T. 2006. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using retarded shoots. **Plant Biotechnology,** 23, 233-237.

Michalczuk, B. & Wawrzyńczak, D. 2004. Effect of medium composition and date of explant drawing on effectiveness of *Agrobacterium*-mediated transformation in the petunia (*Petunia hybrida* Pendula). **J. Fruit and Ornamental Plant Res.,** 12, 516.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol,** 15, 473-497.

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

Peng, J. F., Song, Y., Yuan, P. Cui, X. & Qiu, G. 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials,** 161, 633-640.

Portillo, M., Fenoll C. & Escobar, C. 2006. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: combined effects of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. **Physiologia Plantarum,** 128, 1-7.

Sheehy, R. E., Kramer, M. & Hiatt, W. R. 1988. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** 85, 8805-8809.

Sheerman, S. & Bevan, M. W. 1988. A rapid transformation method for *Solatium tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. **Plant Cell Reports,** 7, 13-16.

Slater, A., Scott, N. & Fowler, M. 2003. **Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants.** New York: Oxford University Press.

Smith, R. H. & Hood, E. E. 1995. *Agrobacterium tumafaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science,** 35, 301-309.

Teixeira, S. T., Melo, W. J. & Sila, E. T. 2005. Heavy metals in a degraded soil treated with sludge from water treatment plant. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.),** 2(5), 49-151.

Tye, R. J. 1991. Konjac Flour: Properties and applications. **Food Technology,** 45, 86-92.

Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. 1999. **Biology of Plants.** New York: Freeman and Company.

Weide, R., Koornneef, M. & Zabel, P. A. 1989. Simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. **Theoretical Applied Genetics,** 78, 169-172.

Wilmink, A. & Dons, J. J. M. 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Mol. Biol. Rptr.,** 11, 165-185.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

สูตรอาหารLB (Luria-Bertani) Broth ประกอบด้วย

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
NaCl	10 กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลาย 1N NaOH หรือ 1N HCl และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ: หากต้องการทำให้เป็นอาหารแข็งให้เติม Agar 15 กรัม

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ประกอบด้วย

ธาตุอาหารหลัก ประกอบด้วย

NH_4NO_3	1,650	มิลลิกรัมต่อลิตร
KNO_3	1,900	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	440	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	370	มิลลิกรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	170	มิลลิกรัมต่อลิตร

ธาตุอาหารรอง ประกอบด้วย

KI	0.83	มิลลิกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	6.2	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	มิลลิกรัมต่อลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	มิลลิกรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร

$COCl_2.6H_2O$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	37.3	มิลลิกรัมต่อลิตร
Na_2EDTA	27.8	มิลลิกรัมต่อลิตร

วิตามิน และสารอินทรีย์ ประกอบด้วย

Nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
Pyridoxine-HCl	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
Thiamine-HCl	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
Glycine	2.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Myo-inositol	100	มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำตาลทราย 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลาย 1N NaOH หรือ 1N HCl และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ: หากต้องการทำให้เป็นอาหารแข็งให้เติม Agar 8 กรัม

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายเข้มข้นและบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายเข้มข้นและบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายเข้มข้น

1. การเตรียม 0.5 M EDTA

ละลาย EDTA.2H_2O จำนวน 181.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนสารหะลายแล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH (ใช้เกล็ด NaOH ประมาณ 20 กรัม) ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม 1 M Potassium acetate

ละลาย Potassium acetate จำนวน 9.82 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 2 M acetic acid เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม 3 M Sodium acetate

ละลาย Sodium acetate.H_2O จำนวน 408.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วย Glacial acetic acid หรือปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วยกรด acetic acid เจือจาง ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม 5 M NaCl

ละลาย NaCl จำนวน 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียม 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS จำนวน 10 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ทำให้อุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลาย ปรับ pH ให้ได้ 7.2 โดยการเติม HCl เข้มข้น 2-3 หยด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร (สวมหน้ากากกันสารพิษเมื่อชั่งสาร และทำความสะอาดพื้นที่บริเวณที่ชั่งสารให้สะอาด เพราะ SDS เป็นฝุ่นผงปลิวได้ง่ายก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบหายใจ)

6. การเตรียม 1 M Tris-HCl pH 8.0

ละลาย Tris base จำนวน 121 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรด HCl เข้มข้น จำนวน 42 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายมีสีเหลืองให้เททิ้ง ใช้ Tris ที่มีคุณภาพดี ทำให้สารละลายเย็นตัวที่อุณหภูมิห้องก่อนจะปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมบัฟเฟอร์

1. DNA extraction buffer

1X DNA	buffer Stock	5 มิลลิลิตร
1.4 M NaCl	5.0 M	1.40 มิลลิลิตร
20 mM EDTA	1.5 M	0.20 มิลลิลิตร
100 mM Tris-HCl	2.0 M	0.25 มิลลิลิตร
1% PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone)		0.05 กรัม
4% CTAB	10 %	2.00 มิลลิลิตร
Distilled H_2O (autoclaved)		1.00 มิลลิลิตร
0.1% β-mercaptophenol	100%	5.00 ไมโครลิตร

2. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

Tris base	108	มิลลิกรัมต่อลิตร
Boric acid	55	มิลลิกรัมต่อลิตร
0.5 mM EDTA pH 8.0	40	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. Loading buffer

0.25% (w/v) bromophenol blue	0.25	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
0.25% (w/v) xylene cyanol FF	0.25	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
40% (w/v) sucrose	40	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. TE buffer (Tris-EDTA buffer)

10 mM Tris-Hcl

1 mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลาย X-gluc (X-gluc assay buffer)

Phosphate buffer	94	มิลลิลิตร
Triton/ethanol	1	มิลลิลิตร
X-gluc stock	5	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Phosphate buffer

KH_2PO_4	100	มิลลิโมลาร์
K_2HPO_4	100	มิลลิโมลาร์

ผสมกันในอัตราส่วน 1: 1 ปรับ pH 7.0

ส่วนประกอบของ Triton/ ethanol

Triton X-100	10 มิลลิลิตร
100% ethanol	40 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

6. การเตรียม Plasmid extraction buffer

Solution I

50 mM glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl pH 8.0

Solution II

0.2 N NaOH

1.0 % SDS

Solution III

5 M Potassium acetate

Glacial acetic acid

7. การเตรียม Marker λ/*Pst* I เตรียม 1X

10X buffer O	2 ไมโครลิตร
λ DNA	4 ไมโครลิตร
Pst I	2 ไมโครลิตร
Water	12 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทุกตัวให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 0.5 M EDTA จำนวน 2 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาววาสนา มณีจันทร์

เกิดเมื่อ 04 พฤษภาคม 2535

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2553 ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2550 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี จังหวัดราชบุรี

พ.ศ. 2547 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนวัดเขาวัง (แสง ช่วงสุวนิช) จังหวัดราชบุรี

งานวิจัยเผยแพร่ Nitchamon Thamaragsa, Warut U-Kong, Wassana Maneechant, Piyanat Setjant and Ruttaporn Chundet. 2014. **Cloning and transformation of cytochrome *b5* gene into *tobacco*.** The 26th annual meeting of the thai society for biotechnology and international conference. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. November 26-29 2014.

นำเสนอแบบบรรยาย วาสนา มณีจันทร์, วารุต อยู่คง และ รัฐพร จันทร์เดช. 2559. การขยายพันธุ์ต้นบุกจากชิ้นส่วนลำต้น. น. M02/1-6. ใน **งานประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่15**. สงขลา: สมาคมพืชสวนแห่งชาติ.

รางวัลที่ได้รับ ได้รับรางวัลชมเชย ในการประกวดโครงงานนวัตกรรมการเกษตร เรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่ออุตสาหกรรม ในงานการประชุมวิชาการ และประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ประจำปี 2560 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติดิเอ็มเพลส โรงแรมดิเอ็มเพลสเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560

อีเมล wasanam32@gmail.com