วิธีการและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย โดยวิธีใช้เครื่องยิงอนุภาค และการใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

Techniques and Parameters Effecting the Transformation Efficiency of Particle Bombardment and *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Dendrobium* Orchid

ปิยนุช ศรชัย[1] รักชนก โคโต[2] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,3]
Piyanuch Sornchai[1], Rakchanok Koto[2] and Sermsiri Chanprame[1,31]

Abstract

The efficiency of two transformation methods, particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation was compared using protocorm-like bodies (plbs) of two commercial cultivars of *Dendrobium* orchid, *Den.* Sonia 'BOM17' and *Den.* Sonia 'Earsakul'. The pCAMBIA1301 plasmid containing β-*glucuronidase* (*gus* or *uidA*) as a reporter gene was used in both methods. The transient GUS expression assay of putative transformed protocorm-like bodies (plbs) was conducted at 5 days after transformation to determine the success of transformation events. For the case of particle bombardment method, the PDS-1000/He (BioRad) particle gun with fixed parameters of 1.0 µm tungsten particle and gas pressure of 1,100 psi were used in combination with two different target tissue distances of 6 and 9 cm. The results demonstrated that, in two orchid cultivars tested, the target tissue distance of 6 cm had higher transient *gus* expression than that of 9 cm. For *Agrobacterium*-mediated transformation, two *A. tumefaciens* strains, EHA 105 and AGL-1, were tested. The results demonstrated that, regardless of orchid cultivar, both strains of bacteria could transferred *gus* gene into orchid well with non-significant difference. However, the comparison between transformation methods revealed that *Agrobacterium*-mediated transformation gave higher gene transfer efficiency than using the particle bombardment. Considering the orchid cultivars, it was revealed that the transformation efficiency in cv.'Earsakul' was significantly higher than in cv.'BOM17' in both transformation methods.

Keywords *: Dendrobium* Orchid, Particle bombardment, *Agrobacterium*-mediated transformation, Transient expression, β-*glucuronidase* (*gus*)

---

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140 และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE)

[1]Center for Agriculture Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand 73140, Thailand and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PREDO-CHE)

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 (ซอยประสานมิตร) กทม 10110

[2]Biology Department, Faculty of Science, Srinakharinwirot University , Sukhumvit 23 (Soi Prasanmitr) Bangkok 10110, Thailand

[3]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[3]Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

รับเรื่อง: กันยายน 2552

* Corresponding author: sermsiri.c@ku.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้พันธุ์การค้าสกุลหวายโซเนีย 2 พันธุ์คือ 'บอม 17' และ 'เอียสกุล' โดยวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาคและการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะซึ่งทั้ง 2 วิธีการใช้พลาสมิด pCAMBIA1301 ที่มียีน *β-glucuronidase* (*gus* หรือ *uidA*) เป็นยีนรายงานผลและตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวภายหลังการถ่ายยีน 5 วัน ผลการทดลองเมื่อพิจารณาในแต่ละวิธีการถ่ายยีน พบว่าการใช้เครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS-1000/He (BioRad) ใช้อนุภาคทังสเตนขนาด 1.0 ไมโครเมตร แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และ ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 และ 9 เซนติเมตร นั้น ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ให้ผลการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* สูงกว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ในกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 และ AGL-1 เป็นพาหะ พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ที่ทดสอบได้ดีและไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนระหว่าง 2 วิธีการ พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และเมื่อพิจารณาเฉพาะกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ พบว่า การถ่ายยีนเข้าสู่ plbs กล้วยไม้พันธุ์'เอียสกุล' มีประสิทธิภาพสูงกว่าในพันธุ์'บอม17' อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทั้งสองวิธีการถ่ายยีนที่ทดสอบ

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีงานวิจัยและพัฒนาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะเหมาะสมตามความต้องการของตลาดโลก เพื่อให้สามารถแข่งขันกับประเทศคู่แข่งได้ค่อนข้างน้อย แนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ลักษณะที่ต้องการ คือ การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น เทคนิคการถ่ายยีน ซึ่งจะช่วยให้สามารถสร้างกล้วยไม้ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมได้มาก เนื่องจากสามารถนำยีนจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ใส่เข้าไปในกล้วยไม้ได้ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเหนือการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน

การถ่ายยีนในกล้วยไม้ในระยะแรกนิยมใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Li *et al*., 1993) ซึ่งมีการศึกษาในกล้วยไม้หลายสกุล เช่น สกุลหวาย (Chai *et al*., 1994; Yu *et al*., 1999; Men *et al*., 2003a; Suwannaketchanatit *et al*., 2007 และ อัญชลี และคณะ, 2007) สกุลดอริทิส สกุลบราสเซีย และสกุลแคทลียา (Knapp *et al*., 2000) ต่อมาจึงมีรายงานการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ได้ถูกดัดแปลง จนมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ (Hiei *et al*., 1994) การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมมีข้อดี คือ สามารถใช้ถ่ายชิ้นส่วนของยีนที่มีขนาดใหญ่ได้ ค่าใช้จ่ายต่ำ และมีตำแหน่งที่เข้าแทรกของยีนในโครโมโซมพืชที่เหมาะสม นอกจากนี้ต้นถ่ายยีนที่ได้จะมีจำนวนชิ้นของยีนที่ถ่ายเข้าไปน้อยทำให้ลดปัญหาของการเกิด gene silencing (Hiei *et al*., 1994; Cheng *et al*., 1997) ซึ่งรายงานแรกของการถ่ายยีนในกล้วยไม้โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ คือ งานวิจัยของ Belarmino and Mii (2000) ซึ่งได้ถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ต่อมามีรายงานความสำเร็จของการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย (Yu *et al*., 2001; Men *et al*., 2003b และ เบญจวรรณ และคณะ, 2552) และสกุลออนซิเดียม (Liau *et al*., 2003)

การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในพืชนิยมใช้การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) ของยีนรายงานผล (reporter gene) เนื่องจากตรวจสอบผลได้ง่ายและรวดเร็วภายใน 2-5 วันหลังการถ่ายยีนซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบปัจจัยต่างๆ ได้พร้อมกันหลายปัจจัย ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ตรวจสอบการถ่ายยีนในพืช ได้แก่ ยีน *gus* หรือ *uidA* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ β-glucuronidase (GUS)

(Jefferson *et al*., 1987) เมื่อเอนไซม์ GUS ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่ไม่มีสี คือ 5-bromo-4-chloro-3-indodyl-β-glucuronide จะได้เป็นสารสีน้ำเงินที่ไม่ละลายน้ำทำให้เห็นเนื้อเยื่อที่มียีนนี้อยู่เป็นสีน้ำเงินเข้ม วิธีการตรวจสอบนี้เรียกว่า GUS histochemical assay (Stomp, 1992)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าของไทย โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค และ การถ่ายยีนโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงและเตรียมเนื้อเยื่อกล้วยไม้

นำ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้สกุลหวายโซเนีย 2 พันธุ์ได้แก่ *Dendrobium* Sonia 'Bom17' ('บอม17') และพันธุ์ *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' ('เอียสกุล') มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (1949; VW) ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นนำก้อน plbs ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร มาตัดตามขวางให้หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร ซึ่งจะได้เนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็น transversely thin cell layers (tTCLs) ที่บางลง เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน (รักชนก และคณะ, 2551) แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน เพื่อปรับสภาพเนื้อเยื่อก่อนการถ่ายยีน

การถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค

นำ plbs ของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม sorbital ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ นาน 4 ชั่วโมง เพื่อเป็นการ pre-treatment แล้วถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He (BioRad) โดยใช้อนุภาคทังสเตนขนาด 1.0 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA1301 โดยใช้ทังสเตน 3 มิลลิกรัม ต่อพลาสมิดดีเอ็นเอ 5 ไมโครกรัม และตกตะกอนดีเอ็นเอลงบนอนุภาคด้วย $CaCl_2$ 2.5 โมลาร์ ร่วมกับ spermidine 0.1 โมลาร์ ตามวิธีการของ Sanford *et al*. (1993) ในการยิงอนุภาคใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 และ 9 เซนติเมตร หลังจากยิงแล้วนำชิ้น plbs ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม sorbital ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ นาน 4 ชั่วโมงแล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW เป็นเวลา 5 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น plbs แล้วนำชิ้น plbs ทั้งหมดมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน g*us* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay

การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

นำ plbs ที่ pre-culture แล้วมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ EHA 105 และ AGL-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และมีจำนวนเซลล์ประมาณ 5 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (OD_{600}≈1) เป็นเวลา 60 นาที บนเครื่องเขย่า แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ นาน 2 วัน แล้วกำจัด *A. tumefaciens* ออกโดยการล้าง plbs ด้วยอาหารเหลวสูตรVW ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime (Claraxim, Siam Bheasach Co., Ltd) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 นาที จากนั้นนำ plbs ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ plbs ทั้งหมดมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว โดยวิธี GUS histochemical assay วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น plbs

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวบน plbs หลังจากผ่านกระบวนการถ่ายยีนทั้ง 2 แบบแล้ว

5 วัน โดยวิธี GUS histochemical assay ตามวิธีการของ Stomp (1992) โดยแช่ plbs ในสารละลาย X-Gluc solution (0.1 M $NaPO_4$, 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 1.0 mM X-glucuronide, 0.1% Triton X-100) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วสกัดคลอโรฟิลล์ออกจาก plbs โดยใช้เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ บันทึกข้อมูลโดยการนับจำนวนชิ้นที่ย้อมติดสีน้ำเงิน และ จำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้น

ผลและวิจารณ์

การถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค

การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ plbs ของกล้วยไม้สกุลหวายโซเนีย 2 พันธุ์ ได้แก่ 'บอม17' และ 'เอียสกุล' โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคและใช้พลาสมิด pCAMBIA1301 ซึ่งมียีน β-*glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว จากผลการทดสอบปัจจัยของระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย พบว่าการใช้ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงกว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ซึ่งในกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ ให้ผลทำนองเดียวกัน (ตารางที่ 1 และ 2)

ผลที่ได้ดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคหลายรายงานที่ได้เลือกใช้เฉพาะระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 เซนติเมตร ถึงแม้ว่าจะใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่แตกต่างกันแต่อยู่ในช่วง 650–1,550 ปอนด์ต่อตารางนิ้วและทดสอบในกล้วยไม้ต่างชนิดกันก็ตาม (Yang *et al*., 1999 ; Yu *et al*., 1999; Knapp *et al*., 2000; Men *et al*., 2003a) ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคที่ถูกกระแทกด้วยแรงดันให้เคลื่อนที่นั้นเมื่อตกกระทบผิวเซลล์ที่อยู่ใกล้กว่าคือระยะห่าง 6 เซนติเมตรอนุภาคจะมีความเร็วมากกว่าและมีแรงมากกว่าจึงสามารถเคลื่อนที่ทะลุทะลวงเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือเซลล์ในชั้นที่ลึกกว่าการใช้ระยะห่างเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มากขึ้นเป็น 9 เซนติเมตร นอกจากนี้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่น้อยกว่ายังมีผลต่อรัศมีการกระจายตัวของอนุภาคโดยทำให้มีการกระจายตัวแคบ ซึ่งส่งผลให้เนื้อเยื่อที่วางเรียงอยู่ตรงกลางและเนื้อเยื่อที่วางเรียงอยู่บริเวณรอบนอกได้รับอนุภาคที่มีปริมาณและแรงตกกระทบใกล้เคียงกัน แต่การใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มากขึ้นทำให้มีรัศมีการกระจายตัวของอนุภาคกว้างขึ้น เนื้อเยื่อที่อยู่ส่วนกลางได้รับแรงตกกระทบมากกว่าเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ (Li *et al*., 1993; Ritala *et al*., 1993) ดังนั้นการใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร จึงให้ผลการทดลองที่มีความสม่ำเสมอมากกว่าการใช้ที่ 9 เซนติเมตร

อย่างไรก็ตาม Suwannaketchanatit *et al.* (2006) รายงานความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่ protocorm ของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ Jaquelyn Thomasโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He (BioRad) โดยใช้อนุภาคทอง และใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 12 เซนติเมตร แรงดันก๊าซฮีเลียม 660 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่วนอัญชลี และ คณะ (2550) รายงานความสำเร็จของการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวายโซเนีย'เอียสกุล' โดยการใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He โดยใช้อนุภาคทองและใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนั้นได้เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ของ *Agrobacterium tumefaciens* สองสายพันธุ์คือ EHA 105 และ AGL-1 พบว่าในกล้วยไม้พันธุ์เดียวกันการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียมทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในส่วนของเปอร์เซ็นต์ชิ้น plbs ที่เกิดจุดสีน้ำเงิน และ จำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้น (ตารางที่ 1 และ 2) อาจเนื่องมาจาก อะโกรแบคทีเรียมทั้งสองสายพันธุ์นี้ จัดเป็นสายพันธุ์รุนแรง (hyper virulent strain) ซึ่งมีต้นกำเนิดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ C58 ที่มี Ti plasmid คือ pTiBo542 (Lazo *et al*., 1991) เช่นเดียวกัน จึงให้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่ง เบญจวรรณ และคณะ (2552) ก็ได้รายงานความสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุล

หวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการการถ่ายยีนทั้ง 2 วิธี

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการการถ่ายยีนระหว่างการใช้เครื่องยิงอนุภาค และการใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ โดยเปรียบเทียบจากปัจจัยที่ดีที่สุดของแต่ละวิธี พบว่า การถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียมให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เครื่องยิงอนุภาคมาก ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายปัจจัยเช่น วิธีการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคมีข้อจำกัดของการใช้พลาสมิดขนาดใหญ่ ซึ่งโดยทั่วไปมีประสิทธิภาพ การถ่ายยีนต่ำกว่าการใช้พลาสมิดขนาดเล็ก (Birch and Bower, 1994) และนอกจากนี้การถ่ายยีนโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะในครั้งนี้มีปัจจัยที่ส่งเสริมให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง เช่น การเลือกใช้ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์รุนแรง รวมทั้งการใช้ acetosyringone ในระหว่างการเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียมและการ co-cultivation เพื่อกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งถ่ายยีนจากเชื้อเข้าสู่พืชให้ทำงานดีขึ้น นอกจากนี้ การเตรียมเนื้อเยื่อที่เหมาะสมทั้งในส่วนของการทำบาดแผลและการกระตุ้น plbs ให้พร้อมเพื่อการแบ่งเซลล์ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Hiei *et al.*, 1994)

พันธุ์กล้วยไม้กับประสิทธิภาพการถ่ายยีน

เมื่อพิจารณาในเรื่องพันธุ์ของกล้วยไม้ที่ใช้ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวเมื่อเฉลี่ยจากทุกปัจจัยในทุกวิธีการของการถ่ายยีนทั้ง 2 วิธี (ตารางที่ 1 และ 2) พบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์กล้วยไม้ที่ใช้ทั้ง 2 พันธุ์อย่างเด่นชัด แม้ว่ากล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์จะมีที่มาและฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันก็ตาม โดยกล้วยไม้พันธุ์ 'เอียสกุล' ให้ผลการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* สูงกว่าพันธุ์ 'บอม 17' ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนอย่างมาก ทั้งการถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค และการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Men *et al*. (2003a) Suwannaketchanatit *et al.*(2006)และอัญชลี และคณะ(2550) ซึ่งรายงานปัจจัยที่เหมาะสมที่แตกต่างกันในกล้วยไม้ต่างพันธุ์กัน โดยพันธุกรรมอาจส่งผลทางอ้อม เช่นอาจส่งผลต่อลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพเพาะเลี้ยง เช่นในกรณีของกล้วยไม้พันธุ์ 'บอม17' ในงานวิจัยนี้ จากการสังเกตพบว่า plbs มีลักษณะค่อนข้างแข็งและอัดตัวกันแน่นกว่าพันธุ์ 'เอียสกุล' จึงอาจส่งผลทางอ้อมให้การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคมีประสิทธิภาพต่ำกว่าในพันธุ์ 'เอียสกุล' ทั้งในด้านจำนวนชิ้นที่ย้อมติดสีน้ำเงิน และ จำนวนจุดสีน้ำเงินที่พบในแต่ละชิ้น plbs และโดยเฉพาะเมื่อพิจารณาร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่พบว่า ในพันธุ์ 'บอม17' เมื่อเพิ่มระยะห่างเนื้อเยื่อเป้าหมายจาก 6 เซนติเมตร เป็น 9 เซนติเมตร อนุภาคไม่สามารถทะลุทะลวงเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้ไม่พบการติดสีน้ำเงินเลย ผลดังกล่าวนี้จึงสนับสนุนข้อสังเกตเกี่ยวกับลักษณะของ plbs ที่อัดตัวกันแน่นซึ่งส่งผลให้การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคมีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นในการถ่ายยีนเข้าสู่พันธุ์ 'บอม17' โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคอาจมีความจำเป็นต้องใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมสูงขึ้น หรืออาจปรับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ plbs ที่มีลักษณะเหมาะสมขึ้น

ส่วนการถ่ายยีน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนั้นพบว่าในพันธุ์ 'บอม17' ก็ให้ผลต่ำกว่า พันธุ์ 'เอียสกุล' อย่างเห็นได้ชัดเช่นเดียวกัน แต่ในกรณีนี้อาจเนื่องมาจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนั้น มีประเด็นเรื่องความจำเพาะเจาะจงระหว่างชนิดและพันธุ์พืชต่อสายพันธุ์ของเชื้อเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์บุกรุกเข้าสู่เซลล์ของกล้วยไม้พันธุ์ 'บอม17' ได้น้อยกว่าพันธุ์ 'เอียสกุล' ซึ่งความจำเพาะของเชื้อต่อชนิดหรือพันธุ์พืชนี้มีรายงานในพืชหลายชนิดด้วยเช่นกัน

สรุป

การถ่ายยีนเข้าสู่ plbs ของกล้วยไม้สกุลหวาย 2 พันธุ์ คือพันธุ์ 'บอม17' และพันธุ์ 'เอียสกุล' โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว โดยใช้เครื่องยิง

อนุภาค พบว่าระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 เซนติเมตรให้ผลการแสดงออกแบบชั่วคราวสูงกว่าระยะ 9 เซนติเมตร ส่วนการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะพบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์คือ EHA 105 และ AGL-1 สามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายได้ดี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายยีนทั้ง 2 วิธี พบว่า การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าวิธีใช้เครื่องยิงอนุภาค ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ของกล้วยไม้นั้น พบว่า การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ ‘เอียสกุล’ ให้ผลดีกว่าพันธุ์ ‘บอม 17’ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการถ่ายยีนทั้ง 2 วิธีการ

Table 1 The average percentage of blue stained plbs pieces of 2 *Dendrobium* orchid cultivars transformed by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation. The transient expression of *GUS* reporter gene was determined by GUS histochemical assay at 5 days after transformation.

	Percentage of blue stained plbs pieces				
	Particle bombardment [1/]		*A. tumefaciens*-mediated [1/]		
Orchid cultivar	Target tissue distance (cm)		*A. tumefaciens* strain		Average of
	6	9	EHA 105	AGL-1	cultivar [1/]
‘BOM 17’	21.7ab	0.0 b	55.0 b	42.8 b	29.9 b
‘Earsakul’	37.5 a	15.0ab	80.0 a	90.0 a	55.6 a
Average	29.6	7.5	67.5	66.6	
Average of method	18.5		67.0		
F-test	*		*		*

[1/] Each of average value is an average of 4 replications each of 10 plbs pieces.
Mean values in the same column followed by common letter are not significant by different at the 5% level of probability by DMRT.

Table 2 The average number of blue spots on each plbs of two *Dendrobium* orchid cultivars transformed by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation. The transient expression of *GUS* reporter gene was determined by GUS histochemical assay at 5 days after transformation.

Orchid cultivar	Particle bombardment[1/]		*A. tumefaciens*-mediated[1/]		Average[1/]
	Target tissue distance (cm)		*A. tumefaciens* strain		
	6	9	EHA 105	AGL-1	
'BOM 17'	**0.3**	**0.0**	**2.1bc**	**1.2c**	0.9b
'Earsakul'	**0.7**	**0.5**	**6.3a**	**5.4ab**	3.2a
Average	0.5	0.25	4.2	3.3	
Average of method	0.37		3.7		
F-test	ns		*		

[1/] Each of average value is an average of 4 replications each of 10 plbs pieces.
Mean values in the same column followed by common letter are not significant by different at the 5% level of probability by DMRT.

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

เอกสารอ้างอิง

รักชนก โคโต, ปาริชาติ เบิร์นส, สนธิชัย จันทร์เปรม และเสริมศิริ จันทร์เปรม. 2551. ความหนาของ Thin Cell Layer ของกล้วยไม้สกุลหวายที่มีผลต่อการเกิด PLBs ใหม่. วารสารวิทยาศาสตร์ เกษตร 39: 255-261

อัญชลี ชูพร้อม, เลิศลักษณ์ เงินศิริ, กฤษณา พินิจ และพัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์. 2550. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. น. 135-144

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์, ราตรี คูหาพิทักษ์ธรรม, รุ่งนะภา ดีโท, มัณฑนา บุญธรรม และ อรวรรณ ชัชวาลการพานิชย์. 2552. การใช้ยีน *GFP* และ *GUS* เป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40: 185-196

Belarmino, M.M. and M. Mii. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of

Phalaenopsis orchid. Plant Cell Reports 19: 435-442.

Birch, R.G. and R. Bower. 1994. Principle of gene transfer using particle bombardment, pp 3-37. *In* N.S. Yang and P. Christou, eds. Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Oxford University Press, New York.

Chai, T.F., Y.S. Chan and N.H. Chan. 1994. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. Plant Journal 6: 441-446.

Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y.Y. Kim and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Scientia Horticulturae 69: 213-224.

Cheng, M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology 115: 971-980.

Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. Plant Journal 6: 271–282.

Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Beran. 1987. GUS-fusions: â-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6: 3901-3907.

Knapp, J.E., A.P. Kausch and J.M. Chandlee. 2000. Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. Plant Cell Reports 19: 983-898.

Lazo, G.R., P.A. Stein and R.A. Ludwig. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. BioTechnology 9: 963-967.

Li, L., Q. Rongda, A. Kochko, C. Fauquet and R.N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Reports 12: 250-255.

Liau, C.H., S. J. You, V. Prasad, H.H. Hsiao, J. C. Lu, N. S. Yang and M. T. Chan. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of an *Oncidium* orchid. Plant Cell Reports 21: 993-998.

Men, S., X. Ming, Y. Wang, R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003a. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. Plant Cell Reports 21: 592–598.

Men, S., X. Ming, R. Liu , C. Wei and Y. Li. 2003b. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture 75: 63–71.

Ritala, A., L. Mannonen, K. Aspegren, M. M. Salmenkallio, U. Kurten, R. Hannus, J.L. Mendez, T.H. Teeri and V. Kauppinen. 1993. Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. Plant Cell Reports 12: 435-440.

Sanford, J.C., F.D. Smith and J.A. Russell. 1993. Optimizing the biolictic process for different biological applications. Mothods Enzymology 217: 483-509.

Stomp, A.M. 1992. Histochemical localization of β-Glucuronidase. In S.R.Gallagher (ed.). GUS protocol : Using the gus gene as a reporter of Gene Expression, pp. 103-113. Academic Press.

Suwannaketchanatit, C., P. Chaisuk, J. Piluek, S. Peyachoknagul and P.S. Huehne. 2006. Evaluation of constitutive promoters for gene

expression in Dendrobium protocorms and flower. Kasetsart Journal (Natural Sciences) 40: 934-943.

Suwannaketchanatit, C., J. Piluek, S. Peyachoknagul and P.S. Huehne. 2007. High efficiency of stable genetic transformation in *Dendrobium via* microprojectile bombardment. Biologia Plantarum 51: 720-727.

Vacin, E. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605-613.

Yang, J., H.J. Lee, D.H. Shin, S.K. Oh, J.H. Seon, K.Y. Paek and K.H. Han. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. Plant Cell Reports 18: 978–984.

Yu, Z., M. Chen, L. Nie, H. Lu, X. Ming, H. Zheng, L.-J. Qu and Z. Chen. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 87–92.

Yu, H., S.H Yang. and C.J Goh. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *DOH*1. Plant Cell Reports 20: 301-305.