การชักนำให้เกิดยอดจากก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสบู่ดำพันธุ์โคราช และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

Shoots Induction of Young Peduncle and Petiole and the Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) cv. 'Korat'

วิชา สิงห์ลอ[1] อัญชิสา ปานแก้ว[2] นงลักษณ์ เทียนเสรี[1/3] เสริมศิริ จันทร์เปรม[1/4] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[1/3]

Wicha Singlo[1], Anchisa Pankaew[2], Nongluck Tienseree[1/3], Sermsiri Chanprame[1/4] and Sontichai Chanprame[1/3]

Abstract

The effects of plant growth regulators TDZ and NAA on callus induction of young peduncle and petiole of physic nut and the effect of BA on plant regeneration from callus were investigated. Young petiole gave better results in callus induction than using young peduncle. The MS medium supplemented with 0.18 µM TDZ was suitable for callus induction from young petiole. The callus obtained was compact and could regenerate into plant with highest frequency when subculturing onto MS medium supplemented with 0.88 µM BA. For the optimized factors effecting *Agrobacterium*-mediated transformation in physic nut callus, the results demonstrated that 42 µM cefotaxime added into culture medium could effectively eliminate *A. tumefaciens* and callus was still able to regenerate. To determine the factors affecting transformation, *A. tumefaciens* strain EHA105 contained plasmid pCAM-EPSPs1304 that has *mgfp*-fused gus*A* as a reporter gene was used. The factors tested including: *A. tumefaciens* at the dilution ratio (OD_{600}=1 : culture medium) of 1:0, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50 and 1:100; inoculation periods of 10, 20, 30 and 40 min and co-cultivation periods of 1, 2, 3 and 4 days. The results revealed that callus transformation using the dilution of *A. tumefaciens* at 1:20, 30 minutes inoculation period and 2 days co-cultivation was the suitable condition which yielded the highest transient *GUS* expression.

Keywords: *Jatropha*, shoot induction, *Agrobacterium*-mediated transformation, optimization, transient expression

---

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE).

[2]สาขาวิชาปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2] Program of Plant Breeding, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3]ภาควิชาพืชไร่นา และ [4]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[3] Dept. of Agronomy and [4]Dept. of Horticulture, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กันยายน 2555

Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จากการศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ที่มีต่อการชักนำก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนสบู่ดำให้สร้างแคลลัส และผลของ BA ที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดการพัฒนาไปเป็นยอดที่สมบูรณ์ พบว่า ก้านใบอ่อนเป็นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่าก้านดอกอ่อน และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากก้านใบอ่อน โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็น compact callus และเมื่อย้ายแคลลัสนั้นมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ พบว่า สามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ในอัตราสูงที่สุด สำหรับการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) นั้น พบว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 42 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมสำหรับการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมภายหลังจากการถ่ายยีนโดยที่แคลลัสยังสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ สำหรับการทดสอบปัจจัยในขั้นตอนการถ่ายยีนนั้นได้ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *mgfp*-fused *gusA* เป็นยีนรายงานผล โดยได้ทดสอบความเข้มข้นของเชื้อ (OD_{600} = 1) จากการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 และ 1:100 ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ 10 20 30 และ 40 นาที และระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 1 2 3 และ 4 วัน พบว่า การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำโดยการใช้สัดส่วนการเจือจางของเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ 1:20 ระยะเวลาปลูกเชื้อ 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำ โดยให้ผลการแสดงออกของยีน GUS แบบชั่วคราวสูงที่สุด

คำนำ

สบู่ดำ(physic nut)เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae สามารถนำเมล็ดมาบีบน้ำมัน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์มากมาย อาทิเช่น ผลิตเครื่องสำอาง สบู่ และเทียนไข เป็นต้น (Duke, 1988) น้ำมันจากสบู่ดำยังสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล ซึ่งสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลหมุนช้าได้(Openshaw, 2000) ในประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสบู่ดำ เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงเช่นกัน แต่ยังไม่มีการผลิตเป็นอุตสาหกรรม เนื่องจากสบู่ดำให้ผลผลิตต่ำกว่าปาล์มน้ำมัน (Burikam and Kavita, 2007) แต่ข้อได้เปรียบของสบู่ดำเมื่อเทียบกับพืชพลังงานชีวภาพอื่น ๆ คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดี ขยายพันธุ์ง่าย และวิธีการสกัดเอาน้ำมันออกสามารถทำได้ง่าย และจากการที่น้ำมันสบู่ดำไม่สามารถนำมาบริโภคได้ จึงไม่มีการแข่งขันในการผลิตเป็นอาหารเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น (Soham *et al.*, 2009)

แม้สบู่ดำจะเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและต้องการการบำรุงรักษาน้อยแต่ยังพบปัญหาในการปลูกสบู่ดำหลายประการเช่น เมล็ดพันธุ์สบู่ดำมีอัตราการงอกต่ำ และเนื่องจากสบู่ดำเป็นพืชผสมข้าม การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดจะทำให้ได้สบู่ดำที่มีลักษณะไม่ตรงกับสายพันธุ์เดิม ส่วนการขยายพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์อาจมีโรคติดมากับท่อนพันธุ์ได้ โดย Heller (1996) รายงานว่าสบู่ดำสามารถเป็นพืชพาหะนำเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในมันสำปะหลังได้ และ Münch(1986) ได้รายงานว่าโรค superelongation ของมันสำปะหลัง ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Sphaceloma manihoticola* หรือ *Elsinoe brasiliensis* สามารถถ่ายทอดข้ามโดยมีสบู่ดำเป็นพาหะได้

ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนเพื่อใช้เป็นเครื่องมือช่วยปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีลักษณะที่ดีขึ้น แต่การนำเทคโนโลยี ดังกล่าวมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งในด้านกายภาพ และชีวภาพ ซึ่งส่งผลต่อ

ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนทั้งสิ้น โดยได้มีการศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำ (Sujatha and Mukta, 1996; Sardana and Batra, 2000) สำหรับการพัฒนาเทคนิคทางด้านการถ่ายยีนเข้าสู่ สบู่ดำ Zong *et al.* (2010) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีน ได้แก่ ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ ระยะเวลาปลูกเชื้อ ระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อและคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชภายหลังจากการถ่ายยีน

อย่างไรก็ตาม ปัจจัยต่างๆ ที่ทดสอบเหล่านี้มักเหมาะสมกับพืชพันธุ์ที่ทดสอบเท่านั้น การถ่ายยีนเข้าสู่พืชต่างสายพันธุ์กัน ยังคงต้องมีการทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมที่เฉพาะเจาะจงสำหรับสายพันธุ์นั้นๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำจากส่วนของก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อน เพื่อใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน และศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ โดยทดลองในสบู่ดำพันธุ์โคราช ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันในประเทศไทย ซึ่งผลงานวิจัยสามารถใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำพันธุ์โคราช ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาผลของ TDZ และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนสบู่ดำ

นำก้านดอกอ่อนสบู่ดำพันธุ์โคราช ที่มีความยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร และก้านใบอ่อนลำดับที่ 2-3 จากปลายยอด มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์® (Na-hypochlorite 6%) ความเข้มข้น 20% และ 10% ที่เติม tween 20 ประมาณ 1-2 หยด แต่ละความเข้มข้นเขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนเป็นท่อนขนาดยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0 0.09 0.18 และ 0.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต α-naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0 0.0053 0.0106 และ 0.0159 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของแคลลัส น้ำหนักแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นการเกิด compact callus วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 8 ซ้ำ ๆ ละ 2 ชิ้น วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test (DMRT)

การศึกษาผลของสาร TDZ ต่อการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสบู่ดำ

นำก้านใบอ่อนสบู่ดำที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตัดเป็นท่อนขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 0.09 0.18 0.27 0.36 และ 0.45 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของแคลลัส น้ำหนักแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 8 ซ้ำ ๆ ละ 2 ชิ้น วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี ANOVAและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การศึกษาผลของ BA ต่อการพัฒนาของยอด

นำแคลลัสสบู่ดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.44 0.88 1.32 และ 1.76 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตร

ต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้น วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 13 ซ้ำ ๆ ละ 1 ชิ้น วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำโดยการใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs1304 ขนาด 12.867 กิโลเบส ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็น backbone มียีน *aroA* และ *hpt* เป็นยีนคัดเลือก และยีน *mgfp*-fused *gusA* เป็นยีนรายงานผล (Rodpeawpan, 2011) ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 103 ไมโครโมลาร์ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง (OD_{600} = 1) จากนั้นนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 9,300 xg นาน 5 นาที แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลวสูตร MS เท่าปริมาตรเดิม ย้ายแคลลัสสบู่ดำที่ถูกตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงแช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 21 42 63 และ 84 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมทุก 7 วัน จนครบ 14 วัน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้น

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสสบู่ดำ

นำแคลลัสสบู่ดำขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime (Claraxim® 10, Siam Bheasach Co., Ltd.) ความเข้มข้น 0 21 42 63 และ 84 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 56 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 บันทึกผลจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้น

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

แบ่งการทดสอบเป็น 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 และ 1:100 เมื่อใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 30 นาที และระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 10 20 30 และ 40 นาที โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อ ที่ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวจากการทดสอบปัจจัยที่ 1 สูงที่สุด และระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน และปัจจัยที่ 3 ระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 1 2 3 และ 4 วัน โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อ และระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวจากการทดสอบปัจจัยที่ 1 และ 2 สูงที่สุด

ขั้นตอนการถ่ายยีนทำโดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 103 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร aceto syringone 100 ไมโครโมลาร์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ 9,300 xg นาน 5 นาที เทอาหาร

เลี้ยงเชื้อออกแล้วแทนที่ด้วยอาหารเหลวสูตร MS เท่าปริมาตรเดิม กวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย แล้วนำไปเจือจางในอาหารเหลวสูตร MS ในสัดส่วน 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 หรือ 1:100 และเติมสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์นำแคลลัสขนาดชิ้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร แช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อ เขย่าเบา ๆ นาน 10 20 30 หรือ 40 นาที แล้วซับเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร aceto syringone 100 ไมโคร โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มืดนาน 1 2 3 หรือ 4 วัน จึงล้างเชื้อออกจากแคลลัสด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 42 ไมโครโมลาร์ แล้วย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 42 ไมโครโมลาร์ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) หลังจากเริ่มถ่ายยีนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987)วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น บันทึกผลเป็นเปอร์เซนต์จำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงิน และให้คะแนนพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนแคลลัส โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 10 ระดับคะแนน แต่ละช่วงคะแนนจะกำหนดให้มีพื้นที่ติดสีน้ำเงิน ช่วงละ 10 เปอร์เซนต์ นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ผลและวิจารณ์

ผลของ TDZ และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนสบู่ดำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านดอกอ่อนของสบู่ดำบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดเกิดเป็นแคลลัสภายใน 1-2 สัปดาห์ โดยพบแคลลัสทั้งชนิด friable callus และ compact callus แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็น friable callus ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ สีขาว ซึ่งจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3 และตายในสัปดาห์ที่ 4 ทั้งนี้การพัฒนาของก้านดอกอ่อนไปเป็น compact callus จะพบเฉพาะชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมนร่วมกันทั้งสองชนิดเท่านั้น โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิด compact callus จากส่วนของก้านดอกอ่อนสบู่ดำคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.0159 ไมโครโมลาร์ โดยมีคะแนนเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus 64.16 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแคลลัสเท่ากับ 4.865 กรัม (ตารางที่ 1)

ส่วนการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสบู่ดำบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีทั้งชนิด friable callus และ compact callus เช่นเดียวกับส่วนของก้านดอกอ่อน แต่ส่วนใหญ่เป็น compact callus ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น สีขาวปนเขียว โดย compact callus จะเกิดได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เพียงชนิดเดียวซึ่งได้แก่อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.09 0.18 และ 0.27 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากส่วนของก้านใบอ่อนมักมีระดับของฮอร์โมนออกซินที่ค่อนข้างสูง(Techapinyawat, 2001) ดังนั้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของก้านใบอ่อนจึงอาจไม่ต้องการออกซินจากภายนอก อย่างไรก็ตามการชักนำให้เกิดแคลลัส การเจริญเติบโตของแคลลัส รวมทั้งลักษณะของแคลลัสยังขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดของเนื้อเยื่อแสง และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งนิยมนำมาใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส (Afshari *et al.* 2011)

ตารางที่ 1 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากก้านช่อดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสบู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (µM)		เปอร์เซนต์เนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส		น้ำหนักแคลลัส (ก./ชิ้นเนื้อเยื่อ)		เปอร์เซนต์เนื้อเยื่อที่เกิด compact callus	
TDZ	NAA	ก้านช่อ	ก้านใบ	ก้านช่อ	ก้านใบ	ก้านช่อ	ก้านใบ
0	0	25	87.5	0.0881 c[1/]	0.0881 e[2/]	0 c[3/]	39.17 e[4/]
0	0.0053	25	100	0.0269 c	0.1505 e	0 c	75.83 abc
0	0.0106	75	100	0.0388 c	0.3673 e	0 c	74.17 abc
0	0.0159	75	100	0.0369 c	0.3674 e	0 c	67.81 bc
0.09	0	12.5	100	0.0358 c	1.3711 de	0 c	89.85 ab
0.09	0.0053	100	100	3.0863 b	3.8256 c	51.65 ab	89.69 ab
0.09	0.0106	100	100	4.9679 a	5.5984 b	43.80 ab	69.81 bc
0.09	0.0159	100	100	4.7816 a	5.4950 b	35.13 b	79.88 abc
0.18	0	25	100	0.0499 c	2.3341 d	0 c	95.70 a
0.18	0.0053	100	100	2.5468 b	5.3810 b	56.97 ab	67.88 bc
0.18	0.0106	100	100	4.6413 a	5.6321 b	57.37 ab	94.04 cd
0.18	0.0159	100	100	4.8650 a	10.0293 a	64.16 a	37.35 e
0.27	0	12.5	100	0.0413 c	2.0488 d	0 c	94.33 a
0.27	0.0053	100	100	2.2595 b	6.0418 b	65.18 a	81.12 abc
0.27	0.0106	100	100	2.9571 b	5.0195 bc	57.44 ab	90.00 ab
0.27	0.0159	100	100	3.6264 ab	8.9320 a	53.29 ab	45.83 de
F-test				**	**	**	**
CV (%)				62.58	34.64	68.46	26.38

[1-4/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ผลของ TDZ ต่อการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสบู่ดำในสภาพปลอดเชื้อ

จากการนำส่วนของก้านใบอ่อนสบู่ดำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 0.09 0.18 0.27 0.36 และ 0.45 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนก้านใบอ่อนสบู่ดำสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้น โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นชนิด compact callus และ friable callus (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1) ก้านใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.09-0.45 ไมโครโมลาร์ ให้แคลลัสที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากันและสูงที่สุด (100%)

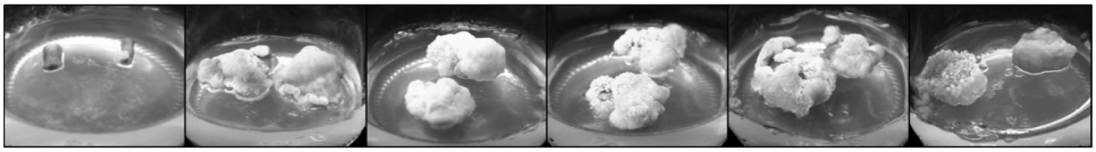
เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus ซึ่งเป็นแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ดี พบว่า การเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสบู่ดำบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ สามารถสร้างแคลลัสชนิด compact callus สูงที่สุดถึง 84.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Burikam and Kavita

(2007) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของสบู่ดำได้แก่ ตายอด ตาข้าง ใบอ่อน ไฮโปคอทิล และ ก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.0045-0.45 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแคลลัสที่ได้นี้สามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากต่อไปได้ ทั้งนี้ Fellman *et al.* (1987) รายงานว่า TDZ เป็นสารประกอบประเภท phenyl urea สามารถกระตุ้นการเกิดเนื้อเยื่อเจริญได้เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ และ Junyan *et al.* (1994) รายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดของเนื้อเยื่อ และส่งเสริมการเกิด somatic embryo ของ *Cayratia japonica* นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบในทำนองเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น เช่น *Carica pentagona* (Zhou and Collet, 1989), *Malus domestica* (Wang *et al*., 1986; Van Nieuwkerk *et al*., 1986) และ *Rubus* sp. (Fiola *et al*., 1990)

ตารางที่ 2 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากก้านใบอ่อนของสบู่ดำเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ TDZ (µM)	เปอร์เซนต์เนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส	น้ำหนักแคลลัส (ก./ชิ้นเนื้อเยื่อ)	เปอร์เซนต์เนื้อเยื่อที่เกิด compact callus
0	87.5	0.0768 b[1/]	2.25 e[2/]
0.09	100	0.7418 ab	52.50 c
0.18	100	1.1613 a	84.38 a
0.27	100	0.8855 a	64.38 b
0.36	100	1.4386 a	49.38 c
0.45	100	1.2483 a	37.50 d
F-test		**	**
CV (%)		72.99	21.82

[1/, 2/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

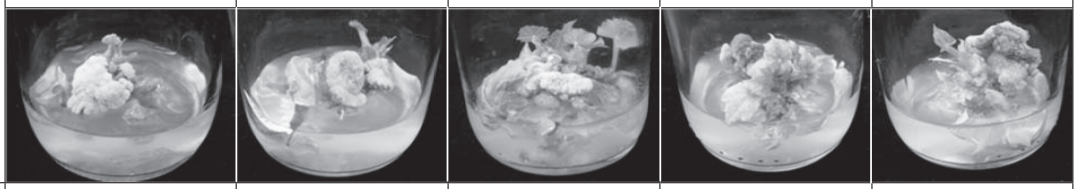


ภาพที่ 1 ลักษณะการเกิดแคลลัสจากก้านใบอ่อนของสบู่ดำ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0-0.45 µM

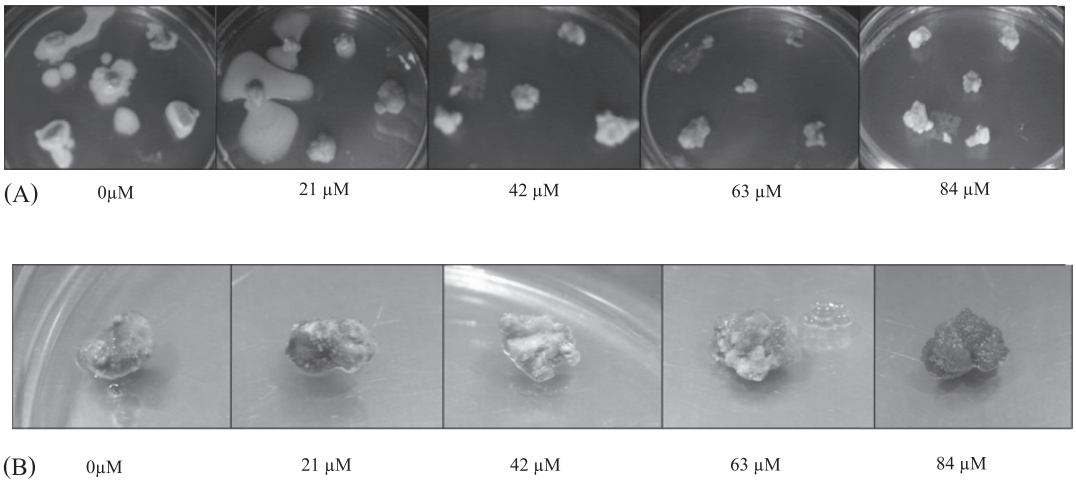
ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการพัฒนาของยอด

จากการนำแคลลัสสบู่ดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 0.44 0.88 1.32 และ 1.76 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0 และ 0.44 ไมโครโมลาร์ มีลักษณะเป็นยอดขนาดเล็ก ส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.88-1.76 ไมโครโมลาร์ มีลักษณะสมบูรณ์และยืดยาวกว่า โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.62 ยอด (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajore และ Batra (2005) ที่พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.285 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากส่วนของปลายยอดสบู่ดำ และ Sujatha และ Reddy (2000) พบว่าการใช้ BA สามารถชักนำให้แคลลัสจากชิ้นส่วนใบของ *Jatropha integerrima* เกิดยอดจำนวนมาก

ตารางที่ 3 การเกิดยอดจากแคลลัสของสบู่ดำ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA นาน 4 สัปดาห์

	ความเข้มข้นของ BA (μM)				
	0	0.44	0.88	1.32	1.76
					
จำนวนยอดต่อแคลลัส	4.0	5.54	6.62	5.25	4.42

F-test: ไม่แตกต่างทางสถิติ, CV (%) = 53.88



ภาพที่ 3 ผลของอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ และ cefotaxime ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* (A) และ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส (B) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และการเจริญเติบโตของแคลลัส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ผ่านการปลูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime พบว่าเชื้อเจริญปกคลุมแคลลัสทุกชิ้นภายในสัปดาห์แรก ส่วนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 21 ไมโครโมลาร์ พบเชื้อเริ่มเจริญอยู่บริเวณรอบ ๆ แคลลัสบางชิ้นเมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 1 สัปดาห์และเจริญจนปกคลุมแคลลัสทั้งชิ้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 2 สัปดาห์ โดยมีจำนวนแคลลัสที่ติดเชื้อ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 42 63 และ 84 ไมโครโมลาร์ ไม่พบการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม (ภาพที่ 3A) แสดงว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นตั้งแต่ 42 ไมโครโมลาร์ ขึ้นไปสามารถใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ออกจากแคลลัสสบู่ดำภายหลังจากการถ่ายยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับผลของ cefotaxime ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 0.18 ไมโครโมลาร์ ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสสบู่ดำ พบว่าแคลลัสทุกชิ้นสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติบนอาหารที่เติม cefotaxime ทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 3B) ซึ่งสอดคล้องกับ Li *et al.* (2008) ที่รายงานว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 105 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลยับยั้งการเกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงของสบู่ดำ ซึ่งผลดังกล่าวนี้พบได้ในพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น อ้อย (Mittal *et al.*, 2009) ข้าวโพด (Danilova and Dolgikh, 2004) ข้าวสาลี (Yu and Wei, 2008) และข้าวฟ่าง (Rao *et al.*,1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

จากการตรวจสอบผลของการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวด้วยวิธี GUS histochemical assay ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยพิจารณาจากจำนวนชิ้นแคลลัสที่ติดสีน้ำเงิน พบว่า ในทุกชุดการทดลองแคลลัสติดสีน้ำเงินทุกชิ้น เมื่อพิจารณาผลของระดับการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อต่อระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัส พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยที่ระดับการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:20 หรือการใช้เชื้อที่ความเข้มข้นต่ำ ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยของพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุดเท่ากับ 6 คะแนน (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดลองปลูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 เข้าสู่ใบอ่อนสบู่ดำของ Zong *et al.* (2010) ที่พบว่า การใช้เชื้อที่ความเข้มข้นสูง ๆ มีผลทำให้ pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง ในพืชชนิดอื่นก็มีรายงานไว้ว่า การใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนลดลง ด้วยเช่นใน *Melastomataceae* spp. (Yong *et al.*, 2006) และ *Juncus effuses* L. (Xu *et al.*, 2009) แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้เชื้อที่ความเข้มข้นต่ำมากเกินไปก็จะทำให้ความถี่ของการส่งผ่าน T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจึงลดลงด้วย (Mannan *et al.*, 2009) สำหรับผลของระยะเวลาการปลูกเชื้อต่อระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัส พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยการปลูกเชื้อนาน 30 และ 40 นาที ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยพื้นที่ติดสีน้ำเงินเท่ากันและสูงที่สุดเท่ากับ 4.27 คะแนน ส่วนการปลูกเชื้อนาน 20 และ 10 นาที ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยลดลงเป็น 2.73 และ 1.73 คะแนน ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ทั้งนี้การใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อน้อยหรือนานเกินไป ต่างส่งผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนทั้งสิ้น โดย Mannan *et al.* (2009) อธิบายว่าการใช้ระยะเวลาปลูกเชื้อน้อยจะส่งผลให้จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนน้อยลงไปด้วย แต่เมื่อใช้ระยะเวลาปลูกเชื้อนานเกินไปทำให้เนื้อเยื่อพืชแช่อยู่ในอาหารเหลวเป็นเวลานานจนอาจอยู่ในสภาวะ hypertonic ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการแตกของเซลล์พืชได้ หรืออาจทำให้เกิดการกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของเซลล์พืชที่มากเกินไปจนทำให้เซลล์ตาย ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้อต่อระดับคะแนนของพื้นที่ติดสีน้ำเงินบนชิ้นแคลลัส พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วยเช่นกัน โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน ให้ระดับคะแนนเฉลี่ยพื้นที่ติดสีน้ำเงินสูงที่สุดเท่ากับ 4.33 คะแนน รองลงมาคือการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 1 4 และ 3

วัน (ตารางที่ 4) ส่วนการทดลองของ Zong *et al*. (2010) พบว่าการเลี้ยงใบอ่อนร่วมกับเชื้อนาน 5 วัน เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ให้ผลการแสดงออกของ GUS แบบชั่วคราวสูงที่สุด ในขณะที่การเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 6-7 วัน ส่งผลให้ชิ้นส่วนใบอ่อนตาย และเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2-3 วัน พบว่าให้ผลการแสดงออก GUS แบบชั่วคราวลดลง แม้ว่าจะมีแนวโน้มในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ ระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่สั้นเกินไป หรือนานเกินไปจะส่งผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน แต่จำนวนวันที่เหมาะสมอาจแตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกัน ดังเช่นที่ Mannan (2009) รายงานว่า เซลล์พืชมีความต้องการ ช่วงเวลาสำหรับการถ่ายทอดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไปในเซลล์แตกต่างกัน ดังนั้นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้อจึงมีความสำคัญ และส่งผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีน โดยระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่สั้นเกินไป จะลดโอกาสการเข้าไปเชื่อมต่อของดีเอ็นเอเป้าหมายกับจีโนมพืช ขณะที่การใช้ระยะเวลาที่นานเกินไป ส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตายได้ เนื่องจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสามารถเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณได้มากเกินไปจนแย่งสารอาหารจากเนื้อเยื่อพืช อย่างไรก็ตามการเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2-3 วัน จะเป็นระยะเวลาที่นิยมใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด (Men *et al*., 2003; Weber *et al*., 2003; Yong *et al*., 2006)

สรุป

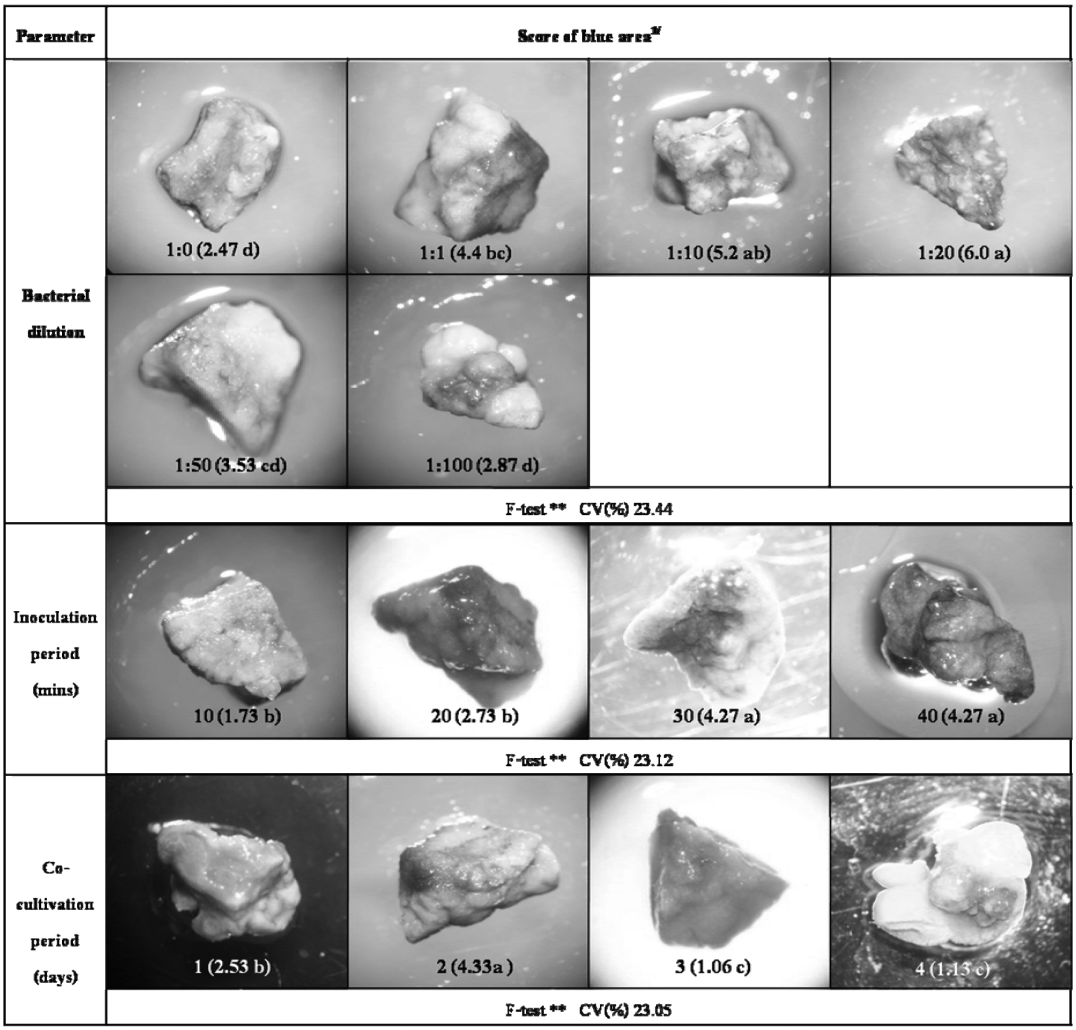
จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำพันธุ์โคราชพบว่าก้านใบอ่อนสบู่ดำเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.18 ไมโครโมลาร์ และการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส สามารถทำได้โดยการย้ายแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.88 ไมโครโมลาร์ ซึ่งยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์ สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดี

จากการทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสบู่ดำพบว่า แคลลัสสบู่ดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้นตั้งแต่ 21-84 ไมโครโมลาร์ สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดได้อย่างปกติ โดยสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 42-84 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับปัจจัยที่เหมาะสมกับการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม จากการตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว พบว่า การเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อที่ 1:20 ใช้เวลาปลูกเชื้อนาน 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน มีจำนวนชิ้นแคลลัสที่ติดสีน้ำเงินเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงินเฉลี่ยมากที่สุด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวง ศึกษาธิการ และโครงการพัฒนาพันธุ์สบู่ดำ ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก บริษัท โพรเทคเตอร์นิวทริชั่น (ประเทศไทย) จำกัด

ตารางที่ 4 การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gusA* ตรวจสอบโดยวิธี GUS histochemical assay เมื่อเวลา 1 สัปดาห์ ภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของสบู่ดำโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ



[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละ parameter มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

ตัวเลขในวงเล็บ (...) คือค่าเฉลี่ยคะแนนของเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน เกณฑ์การให้คะแนนคือ 1-10 ซึ่งแต่ละช่วงห่างกัน 10 เปอร์เซนต์

เอกสารอ้างอิง

Afshari, R.T., R. Angoshtari and S. Kakantari. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics J. 49: 60-67.

Burikam, S. and R. Kavita. 2007. *In vitro* culture of *Jatropha curcas*. pp.130-135. *In* Proc. the 1st Conf. of *Jatropha curcas*. Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Danilova, S.A. and Y.I. Dolgikh. 2004. The stimulatory effect of the antibiotic cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. Russian J. Plant Physio. 51:559-562.

Duke, J.A. 1988. CRC Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 253-254.

Fellman, C.D., P.E. Read and M.A. Hosier. 1987. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. Hort. Sci. 22: 1197-1200.

Fiola, J.A., A. Mahmoud, M.A. Hassan, H.J. Swartz, R.H. Bors and R. McNicols. 1990. Effects of thidiazuron, light fluence rate and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20: 223-228.

Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rept. 5: 387-407.

Junyan, Z., H. Ma, F. Guo and X. Lao. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36: 73-79.

Li, M., H. Li, J. Wu, X. Pan and G. Wu. 2008. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. Plant Cell Tiss. Organ. Cult.92: 173-181.

Mannan, A., T.N. Syed and B. Mirza. 2009. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. Pak. J. Bot. 41: 3239-3246.

Men, S.Z., X.T. Ming, R.W. Liu, C.H. Wei and Y. Li. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 75: 63-71.

Mittal, P., S.S. Gosal, A. Senger and P. Kumar. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. Physiol. Mol. Biol. Plants 15: 257-265.

Münch, E. 1986. Die Purgiernuß (*Jatropha curcas* L.) - Botanik, Ökologie, Anbau. Diploma thesis. University Hohenheim, Stuttgart.

Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas* : an oil plant of unfilled promise. Biomass andBioener. 19: 1-15.

Rajore, S and A. Batra. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. J. Plant Biochem. Biotechnol. 14: 73-75.

Rao, A.M., K.P. Sree and P.B. Kavi Kishor. 1995. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. Plant Cell Rep. 15: 72-75.

Rodpeawpan, K. 2011. Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok.(In Thai)

Sardana, J. and Batra, A. 2000. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. Phytomorphology. 50: 239-242.

Soham, T., G. Hipal, G. Mayank, G Nikhil, P. Prasad, G. Girish, K.K.Vamsia and M.P. Reddy. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. Agric. Sci. 1: 11-20.

Sujatha, M. and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from cultures of *Jatropha curcus.* PCTOC. 35: 293-296.

Sujatha, M. and T.P. Reddy. 2000. Morphogenic responses of *Jatropha integerrima* explants to cytokinins. Biologia Bratislava 55: 99-104.

Techapinyawat, S. 2001. Plant physiology. Department of Botany. Faculty of Science. Kasetsart University. Bangkok. 237p. (in Thai)

Van Nieuwkerk, J.P., R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. Hort. Sci. 21: 516-518.

Wang, S.Y., J.L. Ji, T. Sun and M. Faust. 1986. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator thidiazuron. Phytochem. 25: 311-317.

Weber, S., W. Friedt, N. Landes, J. Molinier, C. Himber, P. Rousselin, G. Hahne and R. Horn. 2003. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. Plant Cell Rep. 21: 475-482.

Xu, L., U. Najeeb, W.Q. Shen, G. Jilani, M. Rasheed and W.J. Zhou. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated BT gene transforma tion system in mat rush (*Juncus effuses* L.) P. J. Bot. 41: 2615-2624.

Yong, W.T.L., J.O. Abudullah and M. Mahmood. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastoma taceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. Sci. Hort. 109: 78-85.

Yu, Y. and Z.-M. Wei. 2008. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. Biologia Plant. 52: 553-556.

Zhou, J.Y. and G. F. Collet. 1989. Studies on cytokinin-activity of thidiazuron I. Effect on callus induction and shoot growth in tissue culture of *Carica pentagona.* Acta Bot. Bor.-Occ. Sinica 9: 203-211.

Zong, H., S. Wang, C. Ouyang, X. Deng, L. Li, J. Li and F. Chen. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Jatropha curcas* young leaf explants with lateral shoot-inducing factor (*LIF*). Agric. Biol. 12: 891-896.