บทที่ 11
การส่งถ่ายยีนสู่พืชกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

จุดประสงค์การเรียนรู้เมื่ออ่านบทที่ 11 จบแล้วนักศึกษาสามารถ

1. สามารถอธิบายประวัติทางพันธุวิศวกรรมได้
2. สามารถอธิบายความสำคัญของพันธุวิศวกรรมได้
3. สามารถอธิบายขั้นตอนการส่งถ่ายยีนสู่พืชได้
4. สามารถอธิบายประโยชน์การส่งถ่ายยีนสู่พืชได้
5. สามารถอธิบายกลไกการส่งถ่ายยีนสู่พืชได้
6. บอกผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการส่งถ่ายยีนสู่พืชได้
7. สามารถอธิบายปัญหาต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีพันธุวิศวกรรมได้
8. สามารถเชื่อมโยงหลักการพันธุวิศวกรรมกับวิทยาศาสตร์สาขาอื่น ๆ ได้

เนื้อหาในบทที่ 11 ประกอบด้วย

1. บทนำ
2. การส่งถ่ายยีนสู่พืช
3. พาหะที่ใช้นำจีนเข้าสู่พืช
4. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีพันธุวิศวกรรม
5. ประโยชน์การส่งถ่ายยีนสู่พืช
6. ขั้นตอนการนำยีนที่น่าสนใจเข้าสู่พืช
7. ปัญหาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช
8. การสร้างพืชแปลงพันธุ์
9. การส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง
10. บทสรุปกลไกการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช
11. แบบประเมินผลท้ายบทและเฉลย

11.1 บทนำ

นับตั้งแต่มีการค้นพบสารพันธุกรรมและการศึกษาค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่อง จนถึงทศวรรษที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบเทคโนโลยีที่สามารถควบคุมและดัดแปลงพันธุกรรมในเซลล์ (genetic manipulation) ที่รู้จักกันในนามของพันธุวิศวกรรม (genetic engineering หรือ recombinant DNA technology) ซึ่งนับว่าเป็นความก้าวหน้าทางวิทยาการอย่างมาก และนับเป็นก้าวสำคัญที่มนุษย์จะสามารถวางแผน ออกแบบ ควบคุม และสร้างลักษณะพันธุกรรมใหม่ ๆ เพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตใหม่ที่มีคุณสมบัติตามต้องการได้ ความสามารถเหล่านี้เปิดโอกาสให้นักวิทยาศาสตร์ได้นำลักษณะสำคัญ ๆ ที่ซ่อนเร้นในธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตมาใช้ศึกษาวิจัยและพัฒนา และนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ เภสัชกรรม และด้านการเกษตร ในด้านการเกษตร พันธุวิศวกรรมจะมีบทบาทอีกอย่างหนึ่ง คือ การปรับปรุงพันธุ์พืช

วิธีการในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ใช้กันมานับศตวรรษนิยมใช้กันอยู่ 2 วิธี คือ การคัดเลือกพันธุ์ (selection) จากความแปรปรวนในลักษณะทางพันธุกรรมของประชากร จนได้พืชที่มีลักษณะตามต้องการและผสมพันธุ์พืชที่มีลักษณะดีเข้าด้วยกัน (hybridization) เพื่อให้ลูกหลานที่เกิดขึ้นเป็นผลรวมของลักษณะดีเด่นจากพ่อและแม่ตามหลักการทางพันธุศาสตร์ของเมลเดล (Mendelian genetics) ในทางปฏิบัติการพัฒนาพันธุ์พืชส่วนใหญ่เกิดจากการผสมพันธุ์เพื่อเปิดโอกาสให้สารพันธุกรรมรวมตัวกัน ทำให้ได้ประชากรที่มีความแปรปรวนในลักษณะทางพันธุกรรมที่มีลักษณะดีตามต้องการ วิธีการดังกล่าวแม้ว่าจะได้ผลดีและก่อให้เกิดจากการรวมตัวกัน ทำให้ได้ประชากรที่มีความแปรปรวนในลักษณะทางพันธุกรรม จากนั้นจึงทำการคัดเลือกพันธุ์เพื่อหาลูกผสมที่เกิดจากการรวมตัวกันของสารพันธุกรรมที่มีลักษณะดีตามต้องการ วิธีการดังกล่าวแม้ว่าจะได้ผลดีและก่อให้เกิดพันธุ์พืชที่ดีมากมาย และยังเป็นวิธีการหลักที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันก็ตาม แต่ก็เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลา แรงงาน และเงินทุนมาก และไม่แน่ใจว่าจะประสบผลสำเร็จเสมอไป ข้อความสำคัญคือการผสมข้าม จะทำได้ต่อเมื่อเป็นพืชพันธุ์ชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากเท่านั้น ดังนั้นการนำพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืช จึงก่อประโยชน์โดยไม่เพียงแต่จะช่วยย่นระยะเวลาในการพัฒนาพืชพันธุ์ใหม่เท่านั้น แต่ยังเปิดโอกาสให้นักวิจัยได้ถ่ายทอดยีนจากสิ่งมีชีวิตต่าง

ชนิดกัน ซึ่งไม่อาจทำได้ในธรรมชาติ อันอาจจะนำไปสู่การปฏิบัติรูปโฉมของการเกษตรในอนาคตได้

วิธีการอย่างง่ายของพันธุวิศวกรรมทำได้โดย ขั้นแรกทำการตัดท่อนดีเอ็นเอ หรือยีนที่ให้ลักษณะตามต้องการจากดีเอ็นเอผู้ให้ (donor DNA) โดยใช้เอ็นไซม์จำเพาะ (restrition enzyme) ซึ่งเอ็นไซม์นี้จะตัดยีนที่ลำดับเบสจำเพาะด้วย ขณะเดียวกันก็เตรียมพาหะ (vector) โดยใช้เอ็นไซม์ชนิดเดียวกันตัดเพื่อให้ลำดับเบสภายหลังการตัดในดีเอ็นเอพาหะมีความสอดคล้อง (complementary) กับลำดับเบสตรงจุดตัดของยีนที่ต้องการ ขั้นต่อมาจึงทำการเชื่อมดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้เอ็นไซม์ไลเกส (ligase enzyme) จะนำให้ได้ดีเอ็นเอสายพันธุ์ผสม (recombinant DNA) ซึ่งโมเลกุลดังกล่าวจะเป็นตัวกลางในการถ่ายสารพันธุกรรมที่ต้องการเข้าสู่ยีนในพืชได้ ในทางปฏิบัติการนำพันธุวิศวกรรมมาใช้ปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ของพืช สามารถทำได้ตามขั้นตอนกว้าง ๆ ดังนี้

1) แยกเซลล์จากพืชและเลี้ยงให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (ในรูปคัลลัสหรือโปรโตพลาส) ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมการก่อนที่จะดัดแปลงหรือสอดแทรกยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ

2) สร้างหรือชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมภายนอกหรือภายในโครโมโซมเพื่อแต่งแต้มหรือควบคุมเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน (manipulation) ให้ได้ลักษณะตามต้องการแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่แสดงลักษณะที่ต้องการไว้ ขั้นตอนในข้อนี้ใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมและอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics)

3) ขยายจำนวนเซลล์เหล่านั้น แล้วกระตุ้นให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์จะเห็นว่าพันธุวิศวกรรมเอื้อประโยชน์ให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถทำการสับเปลี่ยนหรือโยกย้ายยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ซึ่งไม่อาจเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติ จึงเป็นการขยายขอบเขตของความแปรปรวนทางพันธุกรรมหรือยีนพูล (gene pool) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังอาจจะก่อให้เกิดลักษณะใหม่ ๆ ของพืช ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้กันในปัจจุบันไม่สามารถทำได้

การถ่ายยีนจากพืชสองต้นเข้าด้วยกันโดยใช้เทคโนโลยีนี้มีข้อดีที่ไม่ต้องทำงานกับพืชทั้งต้น ทำให้ลดภาระได้มาก และการดึงยีนจากต้นที่เป็นแหล่งยีนแล้วสอดแทรกเข้าสู่ต้นผู้รับ (recipient plant) ในตำแหน่งที่เหมาะสมและไม่รบกวนยีนในตำแหน่งอื่น ๆ แล้วจะทำให้ไม่ต้องกังวลกับยีนอื่นของต้นผู้รับแต่อย่างใด ขณะที่วิธีการปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบัน เมื่อนักปรับปรุงพันธุ์ต้องการปรับปรุงลักษณะหนึ่ง ภายหลังจากการผสมข้ามจะพบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะอื่นเกิดการรวมตัวกันขึ้นด้วย ซึ่งเป็นภาระยุ่งยากต่อนักปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก นอกจากนี้แล้ว การถ่ายทอดยีนโดยเทคโนโลยีนี้ยังสามารถปรับปรุงพันธุ์หรือสร้างพืชชนิดใหม่ได้ภายในการทดลองเดียวหรือเพียงชั่วรุ่น (generation) หนึ่ง ขณะที่วิธีการปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบันต้องและคัดเลือกหลาย ๆ รุ่น ซึ่งใช้เวลานาน ยิ่งไปกว่านั้น พันธุวศวกรรมยังเอื้ออำนวยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำยีนที่สำคัญ ๆ เช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ยีนต้านทานยาปราบวัชพืช ยีนตรึงไนโตรเจนและยีนควบคุมลักษณะสำคัญอื่น ๆ จากสิ่งมีชีวิตที่อยู่นอกเหนืออาณาจักรพืชมาใช้ได้อีกด้วย

ในปัจจุบันมีรายงานถึงความสำเร็จของการทำพันธุวิศวกรรมกับพืชหลายชนิด เช่น การสร้างยาสูบต้านทานไวรัส TMV หรือต้านทานสารปราบวัชพืชไบอลาฟอส (bbialaphos) การสร้างมะเขือเทศ ต้านทานยาปฏิชีวนะในข้าว หน่อไม้ฝรั่ง ฯลฯ ขณะเดียวกันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกก็กำลังทุ่มเทศึกษาวิจัยเพื่อสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ๆ และแสดงหาความรู้เกี่ยวข้องกับยีนในพืชเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเป็นที่คาดคะเนกันว่า ในราวปี ค.ศ. 2000 มนุษย์จะสามารถนำประโยชน์จากเทคโนโลยีนี้มาใช้ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งเมื่อถึงเวลานั้นอาจมีการเปลี่ยนรูปโฉมของการเกษตรไปจากปัจจุบันมาก อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีนี้ต้องใช้ความสามารถของการประยุกต์ขั้นตอนการปฏิบัติต่าง ๆ เพื่อให้บรรลุผลสำเร็จในงานที่ค่อนข้างยาก เช่น งานปรับปรุงพันธุ์พืช ในอนาคตเทคโนโลยีนี้จะสามารถนำมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความสำคัญมากขึ้น อย่างน้อยจะมีส่วนช่วยในการปรับปรุงลักษณะเฉพาะบางลักษณะของพืช ในส่วนที่ยังเป็นจุดอ่อนของวิธีการที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันให้บรรลุผลมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเสริมให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้เข้าใจกลไกของยีน เพิ่มวิธีการที่นำไปสู่การสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่ดีกว่า อันจะนำไปสู่การปัญหาการขาด

แคลนอาหารที่มีคุณภาพ และปัญหาความสมดุลระหว่างอาหารกับประชากรของโลก ในขณะที่อัตราการเกิดและการตายของประชากรโลกยังไม่สมดุลกันเช่นทุกวันนี้

ในบรรดาเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าในปัจจุบัน พันธุวิศวกรรมจัดได้ว่าเป็นเทคโนโลยีที่มีความสำคัญต่อการใช้ศึกษาและเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งขั้นตอนการสร้างหรือชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมทำได้โดยภายหลังจากการแยกเซลล์พืชให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และเลี้ยงให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อแล้วจึงนำท่อนยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการมาต่อเข้ากับท่อนยีนในเซลล์ของพืช จากนั้นจึงชำนำให้ยีนเกิดการแสดงออกในระดับต้นพืช เทคโนโลยีนี้นอกจากจะใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกของยีน ถ่ายทอดยีนซึ่งไม่อาจทำได้ในธรรมชาติ หรือโยกย้ายยีนจากสิ่งมีชีวิตนอกอาณาจักรพืชมาใช้ อันจะช่วยแก้ปัญหาและเสริมประสิทธิภาพของวิธีการปรับปรุงพันธุ์ให้สูงขึ้น แล้วยังเป็นการเพิ่มวิธีการให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถเลือกประสิทธิภาพของวิธีการปรับปรุงพันธุ์ให้สูงขึ้น แล้วยังเป็นการเพิ่มวิธีการให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถเลือกใช้ได้อีกด้วย อย่างไรก็ดีการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ให้ประสบผลควรพิจารณาถึงกลไกรแสดงออกของยีนที่ต้องการปรับปรุง การแยกยีน การ clone ยีน การเลือกใช้พาหะ และการทำการถ่ายทอดยีน การตรวจสอบเซลล์เจ้าบ้านที่มียีนที่ต้องการ รวมถึงการตรวจสอบความคงตัวของยีนด้วย และการเพาะเลี้ยงเซลล์ดัดแปลงนั้นให้เจริญเป็นต้นพืชที่มีการแสดงออกของยีน และถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ ซึ่งถ้าทำได้จะสามารถสร้างพืชให้เหมาะสมกับการเพาะปลูก มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น หรือสร้างพืชพันธุ์ต้านทานโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ฯลฯ อันจะนำไปสู่การปฏิวัติรูปโฉมของการเกษตรไปอย่างสิ้นเชิง

11.2 Transformation

คือการใส่ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรง โดยเวคเตอร์นั้นต้องเป็นพลาสมิด และทำเซลล์ผู้รับให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอกก่อน อาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเซลล์ที่เป็นผู้รับ ถ้าเป็นแบคทีเรีย เช่น *E. coli* ต้องทำให้เซลล์อยู่ในสภาพ competent cell โดยใช้สารบางชนิด เช่น $CaCl_2$ หรือไอออนบวกอื่น ๆ แล้วนำไปผ่านกรรมวิธี heat

shock ในกรณีที่เซลล์ผู้รับเป็นเซลล์พืชเทคนิคการถ่ายฝากจีนมีหลายวิธี เช่น การถ่ายฝากจีนโดยตรง การถ่ายฝากจีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า การถ่ายฝากจีนโดยใช้เข็มฉีด การถ่ายฝากจีนโดยใช้เครื่องยิง และการถ่ายฝากโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* เป็นต้น

11.3 การส่งถ่ายจีนสู่พืช

ความหมายคือ กระบวนการส่งถ่ายจีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นจีนจากพืชเสมอไป อาจเป็นจีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ก็ได้ เช่นอาจเป็นจีนจากแบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ได้ทำให้มีการสอดแทรกของจีนเข้าไปในจีโนมของพืช ซึ่งการสอดแทรกนี้ต้องมีความเสถียร โดยสามารถผ่านขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสและไมโอซีส ซึ่งพืชที่ได้รับจีนเข้าไปเรียกว่าพืชแปลงพันธุ์

11.4 พาหะที่ใช้นำจีนเข้าสู่พืช

พลาสมิด (plasmid)

พลาสมิดเป็น DNA ที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด โครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มักมีจีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ หรือสารที่มีประโยชน์กับแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ทำให้มีความต้านทานต่อ antibiotic พลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะอาจเป็น Ti plasmid ซึ่งพบใน *Agrobacterium tuemefaciens* หรือ Ri plasmid ซึ่งพบใน *A. rhizogenes*

ในการส่งถ่ายจีนที่สนใจเข้าสู่พืชนั้น ส่วนของจีนที่ส่งถ่ายไปต้องมีส่วนที่เรียกว่าโปรโมเตอร์ (promotor) อยู่ในส่วนของจีนนั้น ๆ ด้วย นอกจากนี้ยังต้องมีจีนเครื่องหมาย (selectable marker) และจีนรายงานผล (reporter gene หรือ screenable marker) อยู่ด้วย เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบผลสำเร็จของการส่งถ่ายจีน

11.5 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีพันธุวิศวกรรม

ในอดีตมนุษย์ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม โดยวิธีผสมระหว่างเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียที่เป็นพันธุ์ดีแล้วสังเกตรุ่นลูกที่เกิดขึ้นว่ามีลักษณะดีขึ้นกว่ารุ่นพ่อแม่หรือไม่ หากแต่การปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีดังกล่าวนั้นต้องใช้เวลานานและในบางครั้งผลที่ได้ก็ไม่ได้เป็นตามที่คาดหวังไว้เสมอไป หรือบางครั้งอาจได้ลักษณะที่เราไม่ต้องการเข้าไป

ด้วย จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์คิดค้นวิธีที่จะประหยัดเวลา และให้ผลที่น่าพอใจตามที่เราคาดหวังไว้ แม้ในต่างประเทศการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมเริ่มตั้งแต่ก่อน 700 BC ชาวแอสซีเรียนและบาบิโลเนียนส์ ใช้เทคนิคการผสมเทียม (Artificially pollination) โดยทำการทดลองกับต้น date plam

ช่วงในโลกกำลังขาดแคลนอาหารเนื่องจากประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งอยู่ในช่วงปีคริสต์ศักราช 1960-1970 จึงเป็นช่วงเวลาที่ทำให้มีการปฏิวัติเขียว (green revolution) เพื่อปรับปรุงคุณภาพของพืชให้เพียงพอกับความต้องการตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่พัฒนา เช่น สหรัฐอเมริกา ได้มีการค้นคว้าวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์การเกษตร เพื่อเร่งเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น เช่น การเพิ่มผลผลิตของข้าวสาลี ให้มีผลผลิตสูงโดย นอร์แมน อี โบรลาจ (Norman E. Borlaug) ผู้ซึ่งได้รับรางวัลโนเบล ในปี คริสตศักราช 1970

สาขาพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เริ่มเข้ามามีบทบาทในการพัฒนาการเกษตรแผนใหม่ พันธุวิศวกรรมมีข้อได้เปรียบกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม มากเพราะวิธีทางพันธุวิศวกรรมทำให้เราสามารถเลือกพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามความต้องการได้ในระยะเวลาอันสั้น เมื่อเทียบกับวิธีผสมกลับ ในปัจจุบันนี้เทคนิคการส่งถ่ายยีนสู่พืชมีความก้าวหน้ามาก สามารถถ่ายทอดยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันได้ และสามารถสร้างพืชที่มีความต้านทานต่อโรคและแมลงต่าง ๆ ได้ซึ่งเป็นการลดปัญหาการใช้สารเคมีจำพวกยาฆ่าแมลง และช่วยลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้

11.6 ประโยชน์การส่งถ่ายยีนสู่พืช

1) สร้างพืชต้านทานโรค

เช่น การสร้างพืชต้านทานโรคไวรัส โดยการส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein : CP) ของไวรัสเข้าไปในพืช เช่น หารส่งถ่ายยีนซีพี (CP) ของเข้าไปในยาสูบ ซึ่งพืชที่ยีนนี้จะต้านทานการบุกรุกของไวรัสชนิดนั้น ๆ และชนิดใกล้เคียงได้

2) สร้างพืชต้านทานแมลง

เช่น การส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างสารพิษจากแบคทีเรีย บาซิลลัส ทูรินจินซิส (Bacillus thuringinsis) (bt toxin) เข้าสู่พืชที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ เมื่อแมลงมากินพืชที่

ยีนนี้แล้วแมลงจะตาย ดั้งนั้นพืชที่มียีนนี้จึงมักไม่ถูกแมลงกินเมื่อเทียบกับต้นพืชที่ไม่ได้รับยีน หรืออาจจะใช้ยีนที่กำหนดการสร้างสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase inhibitor) หรือ protein trypsin inhibitor จาก cow pea โดยมีการทดลองถ่ายยีนนี้เข้าสู่ยาสูบพบว่าได้ต้นยาสูบแปลงพันธุ์สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของแมลงได้

อนึ่งประโยชน์ที่ได้จากการสร้างพืชที่ต้านทานแมลงคือ ลดปัญหาการนำเข้าสารเคมีที่เป็นยาฆ่าแมลงจากต่างประเทศได้อีกทางหนึ่ง

3) สร้างพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช

เช่น การสร้างพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช คือสารไกลโฟเสท (glyphosate) (สารไกลโฟเสท จะทำงานยับยั้งการทำงานของสาร อีพีเอสพี ซินเทส EPSP synthase (enolpyruvate shikinase-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งในกระบวนการสร้างกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก) พืชที่ได้รับสารไกลโฟเสทนี้จะเหี่ยวตายเพราะไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนดังกล่าวได้

กลไกการต้านทานต่อสาร ไกลโฟเสท (glyphosate)

สามารถอธิบายได้ 2 วิธีดังนี้

วิธีที่หนึ่ง ให้พืชสร้าง EPSP synthase (enolpyruvate shikinase-3-phosphate synthase) ในปริมาณที่มาก (over product) จึงมีเอนไซม์เพียงพอที่จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้ยีนควบคุมการสร้าง EPSP synthase (enolpyruvate shikinase-3-phosphate synthase) จากพิทูเนียต่อเข้ากับโปรโมเตอร์และถ่ายฝากยีนเข้าสู่ยาสูบซึ่งจะมีการสร้างเอนไซม์ในระดับสูง ทำให้พืชที่ได้รับยีนนี้สามารถต้านทานต่อสารไกลโฟเสท ได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับยีนนี้ เนื่องจากสารไกลโฟเสทเป็นสารเคมีที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSP synthase (enolpyruvate shikinase-3-phosphate synthase) พืชที่สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสท เป็นเพราะสามารถผลิตเอนไซม์ EPSP synthase (enolpyruvate shikinase-3-phosphate synthase) ได้ในปริมาณที่สูงมาก

วิธีที่สอง ทำให้พืชสร้างเอนไซม์ที่ต่างจากปกติ (mutant enzyme) จึงไม่ไวต่อสารกำจัดไกลโฟเสท ทำได้โดยใช้จีน อาโร เอ (aro A) ควบคุมการสร้างเอนไซม์ EPSP synthase (enolpyruvate shikinase-3-phosphate synthase) จากแบคทีเรีย ซัลโมเนลลา

ไทพิมูเรียม *(Salmonella typhimurium)* ซึ่งต้านทานต่อสารไกลโฟเสท นำมาถ่ายฝากลงในยาสูบเพื่อสร้างต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารไกลโฟเสท

4) การสร้างพืชแปลงพันธุ์ชนิดใหม่ที่มีลักษณะดีกว่าเดิม

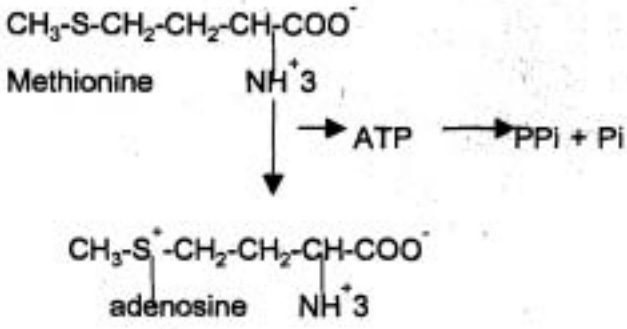
การสร้างพืชแปลงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีกว่าเดิมทำได้โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วย เช่นสร้างพืชที่ทนต่อดินเค็ม ทนต่อสารพิษ และสร้างพืชที่ให้คุณค่าทางอาหารเพิ่มมากขึ้น หรือการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้สูงขึ้น เช่นการถ่ายฝากยีนให้ถั่วเหลืองสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นให้มากขึ้น และการส่งถ่ายยีนกับข้าวโพดเพื่อได้ให้ข้าวโพดที่มีโปรตีนคุณภาพดีขึ้น

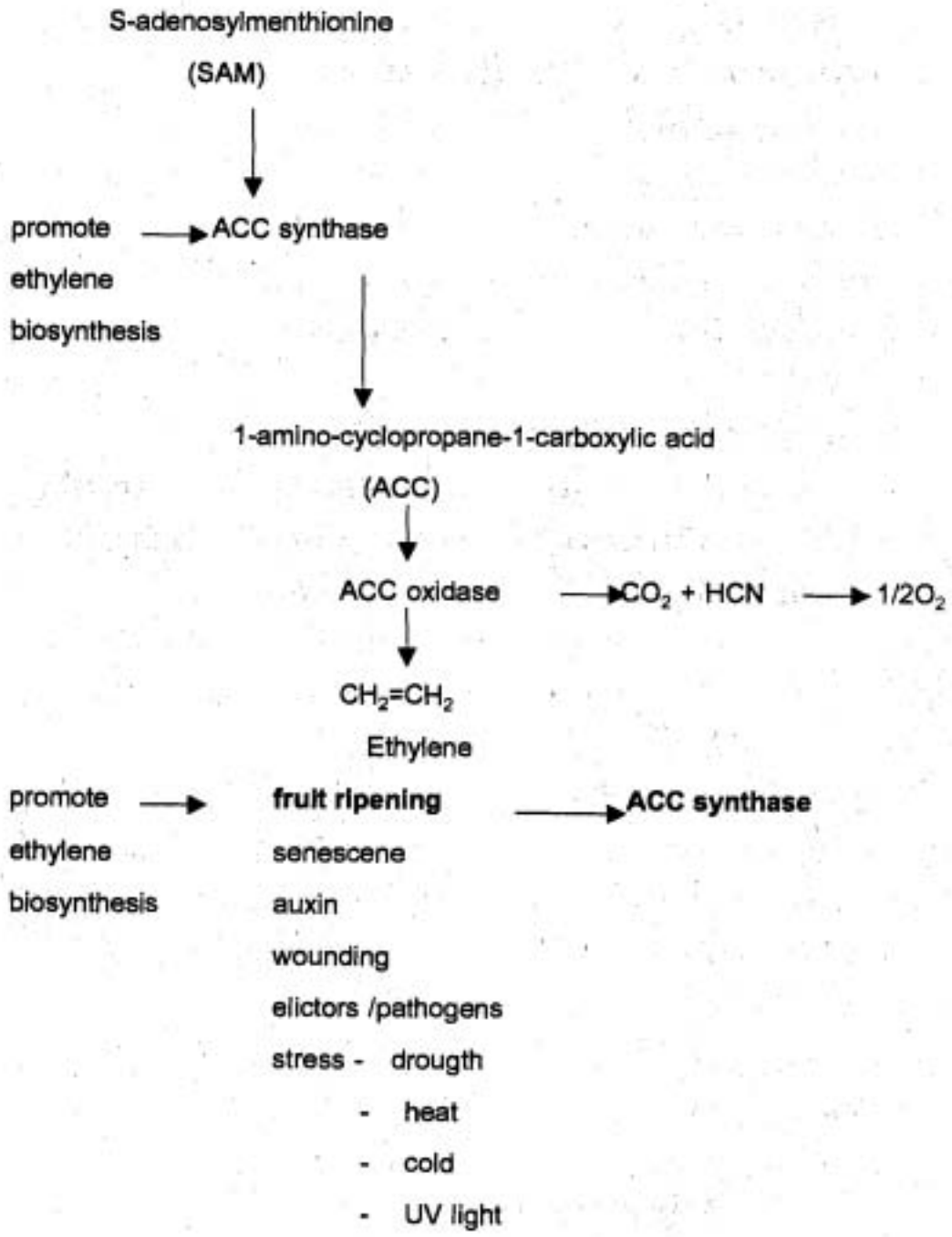
5) การสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

เช่น ข้าวและพืชจำพวกธัญพืชที่เป็นพืชเศรษฐกิจหลักของโลก หรือของประเทศแต่มีข้อด้อยคือไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นักวิทยาศาสตร์จึงได้มีวิธีที่จะย้ายยีนจากพืชใบเลี้ยงคู่ที่มียีนในการตรึงไนโตรเจนได้ตามธรรมชาติ เช่นในพืชตระกูลถั่วทั้งหลาย ไปใส่ในพืชธัญพืช เช่น ข้าวหรือข้าวสาลีเพื่อให้สามารถที่จะตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับพืชตระกูลถั่ว เพราะการตรึงไนโตรเจนทำให้พืชสามารถที่จะสร้างอาหารเพื่อการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเดิม และจะส่งผลให้พืชที่ได้รับยีนนั้นให้ผลผลิตที่สูงขึ้น

6) สามารถเก็บรักษาพืชไว้ได้นานขึ้น โดยไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการขนส่งหรือการเก็บรักษาก่อนการจำหน่ายหรือส่งออก เช่น การสร้างมะเขือเทศที่สุกช้าโดยการส่งถ่ายยีนพวก แอนไทเซน เอซีซี ซินเทส (antisense ACC synthase) และ เอซีซีออกซิเดส (ACC oxidase) ทำให้มะเขือเทศนั้นสร้างสารเอธิลีนช้าลง ส่งผลให้มะเขือเทศสุกช้าลง จึงทำให้สามารถเก็บรักษาได้นาน

<u>กลไกการสร้างสารเอธิลีน</u>




S-adenosylmenthionine
(SAM)
promote
ethylene
biosynthesis
ACC synthase
1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid
(ACC)
ACC oxidase
CO_2 + HCN
$1/2O_2$
$CH_2=CH_2$
Ethylene
promote
ethylene
biosynthesis
fruit ripening
ACC synthase
senescene
auxin
wounding
elictors /pathogens
stress - drougth
- heat
- cold
- UV light

7) สามารถส่งถ่ายยีนเดี่ยวที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าไปในต้นพืชแทนที่จะเข้าไปเป็นกลุ่มเหมือนการผสมพันธุ์พืชตามธรรมชาติจึงทำให้ได้ลักษณะพืชตามที่ต้องการโดยไม่ต้องพ่วงลักษณะที่ไม่ต้องการ

8) ช่วยลดปัญหาการเข้าคู่กันไม่ได้ของยีน เนื่องจากเทคนิคการผสมพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมสามารถทำได้กับพืชที่มีสายพันธุ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น ส่วนพืชที่มีสายพันธุ์ไม่ใกล้ชิดกันจะประสบปัญหานี้ เนื่องจากยีนเข้ากันไม่ได้ ดังนั้นการนำเทคนิคนี้มาใช้จึงทำให้ปัญหาดังกล่าวหมดไป

9) เป็นเครื่องมือทางโมเลกุลาเจนิติกส์ (molecular genetics) ตัวอย่างเช่น ในการวิเคราะห์หาลำดับของดีเอ็นเอ (DNA sequence) หรือหาโปรตีนหรือการแสดงออกของยีน (gene expression)

11.7 ความหมายของการส่งถ่ายยีนสู่พืช

การส่งถ่ายยีนสู่พืช (Plant gene transfer) คือกระบวนการส่งถ่ายยีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช (gene of interest) ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นยีนที่มาจากพืชเสมอไป อาจเป็นยีนมาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็ได้ เช่น อาจเป็นยีนจากแบคทีเรีย หรือจากเชื้อรา จากสัตว์ เป็นต้น ซึ่งผลลัพธ์คือมีการแทรกสอดยีนเข้าไปในจีโนมของพืชได้ ซึ่งการสอดแทรกนั้นต้องมีความถาวรหรือเสถียร (stable) โดยสามารถผ่านขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสและไมโอซิส ซึ่งพืชที่ได้รับจีนเข้าไปเรียกพืชนี้ว่าพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plants) ตัวอย่างพืชแปลงพันธุ์ชนิดแรกนั้นคือพืชที่ได้รับ storage protein phaseolin จากภายนอกเข้าไป

11.8 ขั้นตอนการนำยีนที่น่าสนใจเข้าสู่พืช

ในการนำยีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช แบ่งเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. ต้องมีพาหะ (vector) นำพายีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช
2. ต้องมีการรวมตัวกัน(incorporation) ระหว่างยีนภายนอกและโครโมโซมของพืช
3. ต้องมีการรวมตัวกัน (incorporation) อย่างคงที่ และผ่านขั้นตอนการทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่น (transcription and translation)

4. ต้องมีการถ่ายทอดยีนนั้นโดยผ่านขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสและไมโอซิส

พาหะที่ใช้ในการนำยีนเข้าสู่พืช (Plant gene vectors)

พาหะที่ใช้นำยีนเข้าสู่พืชสามารถแบ่งได้เป็น

1. พลาสมิด (plasmids)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด โครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มักมียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ หรือสารที่เป็นประโยชน์กับแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ทำให้มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ พลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะอาจเป็น Ti plasmid ซึ่งพบใน *Agrobacterium tumefaciens* หรือ Ri plasmid ซึ่งพบใน *A. rhizogenes*

2. Lambda phage

Lambda phage มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอ เกลียวคู่ขนาดประมาณ 48,000 bp. เมื่ออยู่ในอนุภาคของ Phage DNA จะเป็นสายเดี่ยว แต่เมื่อเข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* แล้วปลายที่เป็นสายเดี่ยวจะวกกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวน

3. Yaest Artificial Chromosome (YAC)

YAC เป็นเวคเตอร์ที่มีลักษณะคล้ายโครโมโซมขนาดเล็ก Yaest Artificial Chromosome จะประกอบด้วยเซนโทรเมียร์และทีโลเมียร์เป็นเวคเตอร์ที่ใช้กับยีนที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 400,000 bp. ซึ่งไม่สามารถใช้กับเวคเตอร์ชนิดอื่นได้

4. Virus

ไวรัสที่ใช้เป็นพาหะเช่นพวก CaMV (Cauliflower mosaic virus)

5. Cosmid

คือพลาสมิดที่มีส่วนของคอสไซท์ ของแลมบ์ดาฝาจ อยู่คอสมิดมีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวของแบคทีเรีย มียีนเครื่องหมายใช้เป็นตัวคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับคอสมิด

11.9 ปัญหาการส่งถ่ายยีนสู่พืช

ปัญหาการส่งถ่ายยีนสู่พืชมีดังต่อไปนี้ คือ

1. ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิดไม่เป็นที่อาศัยของ *Agrobacterium*

2. สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* ค่อนข้างจำเพาะต่อพืชมาก ทำให้การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยใช้ *Agrobacteriumv* อาจมีปัญหาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

3. การส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* จะต้องมีขั้นตอนของการกำจัดแบคทีเรียชื่อ *Agrobacterium* เมื่อส่งถ่ายยีนเรียบร้อยแล้ว ถ้าไม่กำจัดอาจเป็นอันตรายต่อพืชได้

4. ในพืชบางชนิดการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ยากมาก ตัวอย่างเช่นพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พืชตระกูลถั่ว และพืชมีเนื้อไม้ (woody species) ดังนั้นแม้จะมีการ transformation สำเร็จแต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ก็ไม่เกิดประโยชน์อะไร

5. ในการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง (direct transformation) นั้นไม่อาจใช้ selectable marker เป็นพวกสารปฏิชีวนะได้ (antibiotic) เพราะถ้าใช้จะทำให้เอ็มบริโอที่ยังอ่อนอยู่ (immature embryo) ตายก่อนที่จะเจริญไปเป็นต้นได้

6. การส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรงบางครั้งพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) ที่ได้อาจไม่คงที่ (stable) เป็นการแสดงออกเพียงชั่วคราวถือเป็น transient expression

7. ปัญหาการอีกปัญกาหนึ่งคือ การแสดงออกของยีนในเซลล์ที่ต้องการ และในเวลาที่ต้องการ ซึ่งต้องเฉพาะเจาะจงมากที่ทำให้บางครั้งไม่มีการแสดงออกของยีน

ข้อควรระวังเกี่ยวกับเทคโนโลยีการส่งถ่ายยีนสู่พืช

ทุกสิ่งทุกอย่างเมื่อมีประโยชน์ก็ย่อมมีโทษบ้าง ดังนั้นการส่งถ่ายยีนนี้จึงควรมีข้อควรระวังดังต่อไปนี้

1. อาจเกิดความเป็นพิษ หรือเกิดเชื้อโรค เช่น ไวรัส ตัวใหม่ ๆ ขึ้นได้

2. อาจเกิดการทนทานต่อยากำจัดวัชพืช จนกระทั่งไม่สามารถควบคุมวัชพืชนั้น ๆ ได้

3. อาจมีความเสี่ยงสูง ถ้าเราไม่ทราบว่ายีนที่สอดแทรกเข้าไปนั้นจะไปทำอะไรในพืชบ้าง

4. ความเสี่ยงอันเนื่องจากการผสมข้ามระหว่าง สปีชีส์ เช่น หญ้า กับข้าว อาจจะได้พืชพันธุ์ใหม่ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น

5. ยีนที่นำมาศึกษานั้น อาจถูกส่งต่อไปสู่พืชชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการได้

6. อันตรายต่อสภาพแวดล้อมที่คาดไม่ถึงเช่น เกี่ยวกับห่วงโซ่อาหารในธรรมชาติอาจเปลี่ยนแปลงไป

7. การทิ้งสารเคมี และเชื้อแบคทีเรียโดยไม่ระมัดระวังอาจทำให้แพร่กระจายไปสู่สภาพแวดล้อม ซึ่งอาจเป็นอันตรายทั้งต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม

ข้อมูลพื้นฐานที่ต้องศึกษาก่อนที่จะส่งถ่ายยีนสู่พืช

ก่อนเริ่มต้นการส่งถ่ายยีนสู่พืชนั้นต้องมีการศึกษาข้อมูลดังต่อไปนี้

1.การศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้พืชนั้นเกิดต้นใหม่ให้ได้เปอร์เซ็นต์ที่สูง

2. การหาชนิดของ *Agrobacterium* ที่เจาะจงต่อพืชที่เราต้องการส่งถ่ายยีนเข้าไป

3. คัดเลือกสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการทำจัดเชื้อ *Agrobacterium*

4.คัดเลือก selecting agent ที่เหมาะสมในการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plants)

11.10 การสร้างพืชแปลงพันธุ์

การสร้างพืชแปลงพันธุ์โดยใช้ Agrobacterium –mediated transformation ขึ้นอยู่กับความสามารถในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชและในชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่นั้น มีวิธี 2 วิธี ดังนี้คือ

1. protoplast co-cultivation โดย incubate protoplast กับ *Agrobacterium* หลังจากนั้น centrifuge เอา *Agrobacterium* ออก แล้วเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ให้สร้างแคลลัส ซึ่งต่อมาจะใช้ antibiotic เป็นตัวคัดเลือก (select) transgenic tissue และต้องทำจัด *Agrobacterium* ให้หมดไปจากนั้นจึงชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดและรากต่อไป

2. tissueexplant inoculatioโดย incubate explants เช่น leaf disc กับแบคทีเรีย *Agrobacterium* จากนั้นนำ leaf disc ไปวางบนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส และคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ โดยใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic) จากนั้นจึงชักนำให้เกิดเป็นต้นต่อไป

ข้อดีของการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium*

1. สามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือโพรโทพลาสต์ได้
2. เนื่องจาก ทีดีเอ็นเอ (T-DNA) มี border sequence เป็นบริเวณที่กำหนด

ขอบเขตที่แน่นอนของชิ้นดีเอ็นเอ เมื่อสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืชแล้ว จึงไม่พบว่ามีการจัดเรียงตัวผิดไป แต่ถ้าใช้ระบบส่งถ่ายดีเอ็นเอโดยตรง พลาสมิดที่เข้าไปในเซลล์พืชจะมีการจัดเรียงตัวและเกิดการต่อกันหลายโมเลกุลก่อนที่เกิดการสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมพืช จึงเป็นเหตุให้เกิดการจัดเรียงตัวของโครโมโซมพืชผิดไป

ขั้นตอนการสร้างพืชแปลงพันธุ์โดยใช้ *Agrobacterium*

การสร้างพืชแปลงพันธุ์โดย *Agrobacterium* ใช้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การส่งยีนที่ต้องการศึกษาเข้าสู่ *Agrobacterium*
2. ให้ *Agrobacterium* นำยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์พืช
3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อและคัดเลือกต้นที่เจริญจากเซลล์ที่ได้รับยีนนั้น
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นพืชที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว

กลไกการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช

ขั้นตอนการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืชมีขั้นตอนดังนี้

1. พืชที่เกิดบาดแผลสังเคราะห์สาร acetosyringone (AS) ซึ่งเป็นสารพวกฟีโนลิค (phenolic compound) และปลดปล่อยออกมาจากบริเวณที่มีบาดแผล
2. สาร phenolic compound ไปกระตุ้นผลิตผลของยีน chv ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* ทำให้ *Agrobacterium* เข้าไปเกาะกับเซลล์พืชตรงบริเวณที่มีบาดแผล
3. โปรตีนจากยีน Vir A ทำหน้าที่เป็น chemoreceptor จดจำ AS และไปกระตุ้นให้ Vir G ทำงาน
4. โปรตีนจากยีน Vir G ไปกระตุ้น Vir อื่น ๆ ให้ทำงานและในที่สุดกระตุ้น Vir D ให้ทำงาน
5. โปรตีนจากยีน Vir D ซึ่งเป็นเอนไซม์ endonuclease ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่งของ RB และ LB
6. เกิด T-DNA สายเดี่ยว หรือ t- strand
7. Vir gene จะทำหน้าที่ส่ง t-strand เข้าสู่เซลล์พืชซึ่งจะไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช
8. เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ในส่วนของ T-DNA ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการ

แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากมายแล้วกลายสภาพเป็นเนื้อเยื่อ ที่เป็นปุ่มปม (crown gall) และมีการผลิตสารออกโทปีนออกมาก

9. สารออกโทปีนจะไปเหนี่ยวนำให้เกิดการลอกรหัสของยีน ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เพื่อใช้สารนี้เป็นแหล่งพลังงาน

ตารางสรุปข้อดีและข้อเสียของการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยวิธี *Agrobacterium* mediated transformation

ข้อดี	ข้อเสีย
1. มีประสิทธิภาพสูงในการที่จะสร้างพืชแปลงพันธุ์เมื่อเทียบกับวิธีส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง 2. เป็นวิธีการที่ง่ายเมื่อเทียบการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง 3. อาจใช้ส่วนของพืชส่วนใดก็ได้ไม่จำเป็นต้องใช้โพรโทพลาสต์หรือเซลล์เหมือนวิธีตรง ซึ่งการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยใช้ ***Agrobacterium*** ส่วนของพืชที่ใช้อาจเป็น ใบ ก้านใบ ปล้อง หรือใบเลี้ยง 4. ค่าใช้จ่ายถูก 5. พืชแปลงพันธุ์ที่ได้จะทีความคงที่ของยีน ซึ่งไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง	1. มีความยุ่งยากในการกำจัด ***Agrobacterium*** 2. ***Agrobacterium*** แต่ละสายพันธุ์ (strain) จะเจาะจงกับพืชแต่ละชนิด ซึ่งเป็นการยุ่งยากในการหา ***Agrobacterium*** ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด

11.11 การส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง (Direct gene transfer)

การส่งถ่ายยีนโดยใช้ ***Agrobacterium*** มีข้อจำกัดหลายอย่างได้แก่ มีความยุ่งยากในการกำจัด ***Agrobacterium*** และ ***Agrobacterium*** แต่ละสายพันธุ์ (strain) จะเจาะจงกับ

พืชแต่ละชนิด ซึ่งเป็นการยุ่งยากในการหา ***Agrobacterium*** ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลีและข้าวฟ่าง นักวิทยาศาสตร์จึงหันมาสนใจแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง ซึ่งมีหลายวิธีดังนี้

1. การส่งถ่ายยีนโดยใช้สาร Polyethylene glycol (PEG)

สาร Polyethylene glycol (PEG) มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการรวมตัวกันของโพรโทพลาสต์ และจากคุณสมบัตินี้สาร Polyethylene glycol (PEG)จึงถูกนำมาใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการชักนำ ดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์

2. การส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation)

3. การส่งถ่ายยีนโดยใช้ Microprojectile microprojectile bombardment particle gun

4. การส่งถ่ายยีนโดยใช้ Microinjection

5. การส่งถ่ายยีนโดยเข้าสู่ single cell หรือ Protoplast โดยใช้ microinjection

6. การส่งถ่ายยีนโดยเข้าสู่ multicellular structure โดยใช้ microinjection

7. การส่งถ่ายยีนโดยใช้ Electrophoretic

8. การส่งถ่ายยีนโดยใช้ Ultrasonication

9. การส่งถ่ายยีนโดยใช้วิธีอื่น ๆ

จีนรายงานผล หรือ reporter gene หรือ screenable marker

จีนรายงานผลเป็นจีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับจีนนั้น มีการแสดงออกหรือไม่และแสดงออกได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อส่วนใด ตัวอย่างเช่น gus (beta-glucuronidase)

beta-glucuronidase (gus) gene

เป็นจีนจากแบคทีเรีย *E. coli* นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการศึกษาด้านชีวโมเลกุล เอนไซม์ beta-glucuronidase ทำหน้าที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ของ glucuronidase เนื่องจากมีการสันนิษฐานว่าไม่พบกิจกรรมของ intrinsic gus ในพืชชั้นสูง อันเป็นเหตุผลที่สำคัญที่ทำให้มีการใช้จีน gus เป็น reporter gene

การตรวจสอบผลการแสดงออกของจีน

หลังจากที่มีการส่งถ่ายจีนเข้าไปในพืชแล้วต้องมีการตรวจสอบพืชว่ามีการแสดงออกของจีนหรือไม่ อาจตรวจสอบได้โดยวิธีการดังนี้

gus assay

การใช้จีน gus เป็นจีนรายงานผลนั้น gus gene จะเป็นตัวกำหนดการสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase ซึ่งจะเปลี่ยน substrate (X-gluc) ที่เติมลงไป หรือสาร 5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D glucuronide ให้เป็นสารอินโดลิล (indolyl derivatives) ที่มีสีฟ้าของ 5-bromo-4-chloro-indico ดังสมการ

$$\text{X-gluc} \xrightarrow{\beta\text{-glucuronidase}} \text{5-bromo-4-chloro-indico}$$

(5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D glucuronide) (ทำให้เนื้อเยื่อพืชมีสีฟ้า)

ดังนั้นถ้าเนื้อเยื่อพืชได้รับ DNA สายผสมไป ก็จะทำให้เนื้อเยื่อของพืชส่วนที่ได้รับ gus gene มีสีฟ้า

การส่งถ่ายจีนโดยใช้ *Agrobacterium*

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิด aerobic bacteria ที่อาศัยอยู่ในดิน เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ก่อให้เกิดการส่งถ่ายจีนตามธรรมชาติหรือก่อให้เกิดพันธุวิศวกรรมตามธรรมชาติ จัดอยู่ใน Family Rhizobiaceae

Agrobacterium มี 4 ชนิด คือ

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *A. rubi*
3. *A. rhizogenes*
4. *A. radiobacter* ซึ่งเป็น avirulent sp.

ชนิดที่สำคัญ คือ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งก่อให้เกิดโรค crown gall และ *A. rhizogenes* ซึ่งก่อให้เกิดโรค hairy root

ภายในเซลล์ *Agrobacterium* มี extrachromosomal plasmid ขนาดใหญ่ มีขนาดประมาณ 200 kb โดยพบว่ามี Ti (turmor inducing) plasmid ใน *Agrobacterium tumefaciens* และ Ri (root inducing) plasmid ใน *A. rhizogenes*

Ti plasmid ใน *Agrobacterium tumefaciens* เป็น DNA รูปวงแหวนอยู่นอกโครโมโซม Ti plasmid ที่พบมาก 2 ชนิด คือ ชนิดออกโทปีน (octopine) และโนปาลีน (nopaline)

สารพวกออกโทปีน และโนปาลีนเป็นสารโอปีนที่เซลล์พืชบริเวณที่ถูกบุกรุกด้วย *Agrobacterium* สร้างขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti พืชที่เป็นโรค crown-gall tumour จะผลิตสารโอปีนชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

โอปีน (Opine)

โอปีน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ *Agrobacterium* จะนำไปใช้ โอปีน แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. ออกโทปีน (octopine) เป็น carboxyethyl derivative ของ อาร์จีนีน (arginine)
2. โนปาลีน (nopaline) เป็น dicarboxypropyl derivative ของ อาร์จินีน (arginine)
3. อะโกรปีน (agropine) เป็น bicyclic sugar derivative ของกรดกลูตามิค (glutamic acid)
4. อะโกรซิโนปีน (agrocinopine) เป็นสาร พวก phosphorylated sugar

Ti plasmid

Ti plasmid ที่พบใน *Agrobacterium tumefaciens* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค crown-gall diseases

Ti plasmid จะมี 2 บริเวณที่มีความสำคัญต่อการส่งถ่ายจีนสู่พืช คือ

1. T-DNA (transfer DNA)

Ti plasmid

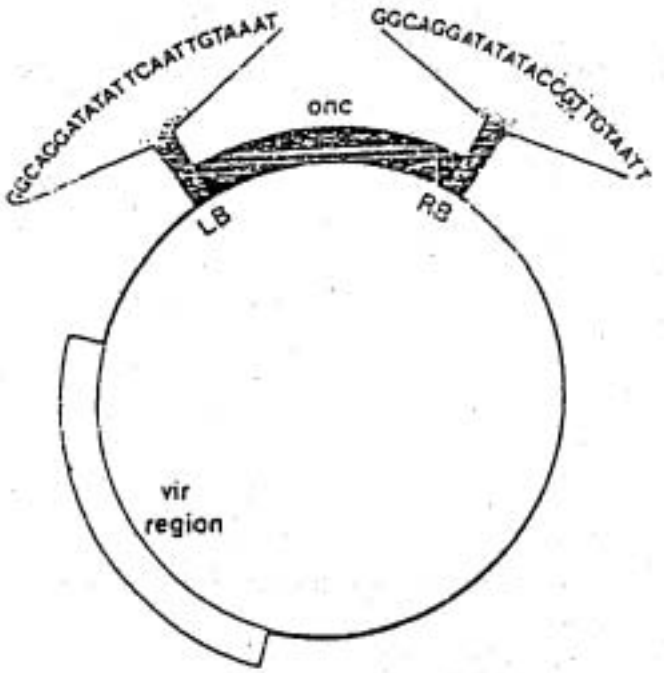
Ti plasmid ที่พบใน *Agrobacterium tumefaciens* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค crown-gall diseases

Ti plasmid จะมี 2 บริเวณที่มีความสำคัญต่อการส่งถ่ายจีนสู่พืช คือ

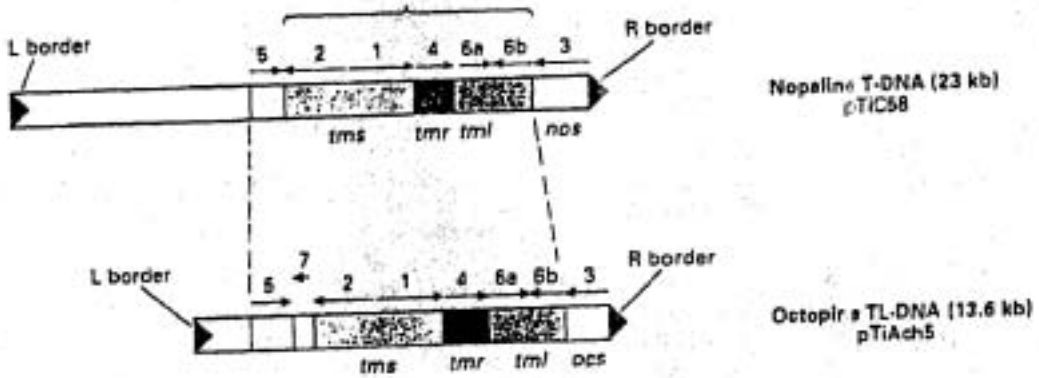
1. T-DNA (transfer DNA)
2. Vir region (virulence region)

T – DNA

T-DNA ประกอบด้วย DNA ประมาณ 23 kb ขอบเขตของ DNA กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) ประมาณ 25 bp อยู่สองข้างของ T-DNA ซึ่งเรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) ดังแสดงในภาพ **11.1** ในพบว่าบน T-DNA มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารโอปีน ฮอร์โมนออกซิน และไซโทไคนิน ดังแสดงในภาพ **11.2**



ภาพที่ 11.1 แสดง left border (LB) และ right border (RB) ที่อยู่สองข้างของ T-DNA



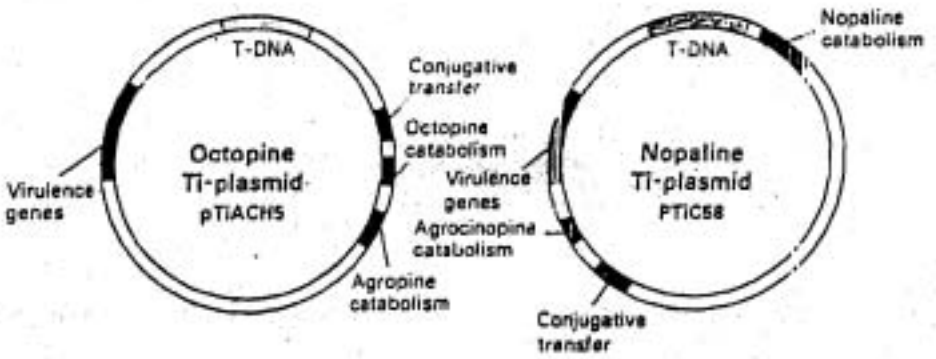
ภาพที่ 11.2 แสดงโครงสร้าง T-DNA ที่กำหนดการสร้างสารโนปาลีน (บน) และออกโทปีน (ล่าง)

Vir region

ส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จาก *Agrobacterium* ไปยังพืช คือ ส่วนของ Vir region ซึ่งมีขนาดประมาณ 35-40 Kbp กลุ่มจีนนี้ประกอบด้วย จีน 6 ตำแหน่งคือ Vir A, Vir B, Vir C, Vir D, Vir G และ Vir E

การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช

การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชเกิดขึ้นจากการทำงานของ virulence gene และ chv gene คือจีนที่อยู่บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของ Vir region บน Ti plasmid ได้ด้วย specific wound substance ซึ่งเป็นสารพวก phenolic compounds เช่น acetosyringone และ alphahydroxy ดังแสดงในภาพที่ **11.3** ซึ่งปลดปล่อยออกจากบาดแผลของพืช



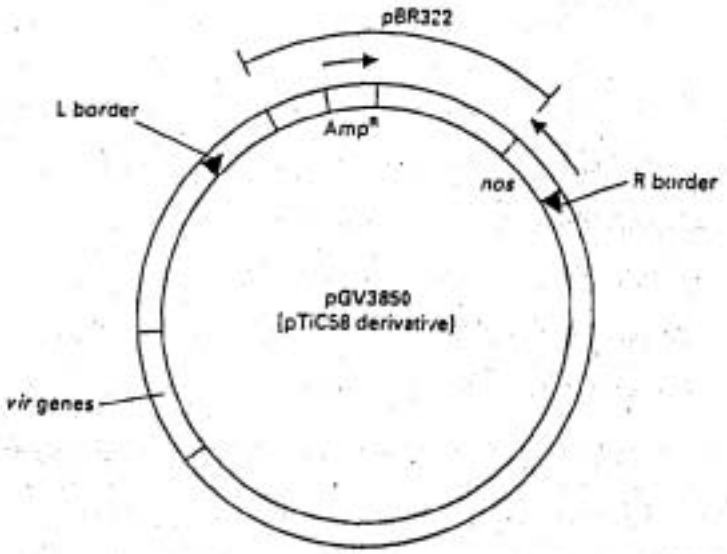
ภาพที่ 11.3 แสดงพลาสมิด Ti ชนิดออกโทปีน (ซ้าย) และโนปาลีน (ขวา)

กลไกการส่ง T-DNA สู่เซลล์พืช

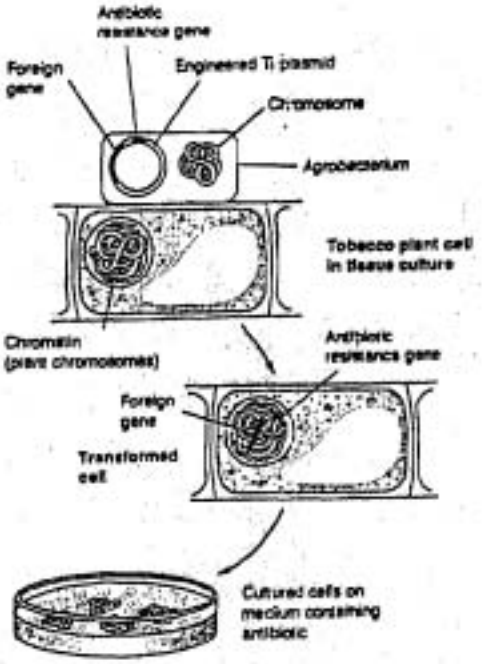
กลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มจีน Vir region ที่อยู่ใน Ti plasmid

ขั้นตอนแรกสุดที่ *Agrobacterium* จะบุกรุกเซลล์พืชได้ คือ *Agrobacterium* จะเข้าเกาะที่ตำแหน่งจำเพาะบนเซลล์พืช สารที่เป็นตัวรับรู้ (receptor) ของเซลล์พืชอยู่ที่ผนังเซลล์ซึ่งคาดกันว่าอาจจะเป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน จากการศึกษาพบว่า บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* มีจีนที่ควบคุมการเข้าเกาะกับเซลล์พืช คือ จีน chv เมื่อพืชมีบาดแผลจะหลั่งสารฟีนอลลิก เช่น acetosyringone (4-acetyl 2, 6 dimethoxy phenol) ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ vir gene มีการแสดงออก คือ มีการลอกรหัสและแปลรหัสออกมา โดยมีโปรตีนของ Vir A ทำหน้าที่เป็น chemoreceptor รับรู้สารประกอบของพืช Vir A มี hydrophobic region 2 ตำแหน่งอยู่ทางด้านปลายกรดอะมิโนซึ่งจะเกาะอยู่กับเยื่อหุ้มออร์กาเนลล์ภายในเซลล์ ส่วนปลายคาร์บอกซิลอยู่ในไซโทพลาซึม และมีความสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าสู่โมเลกุลเองได้ (autophosphorylating activity) ดังแสดงในภาพ จากนั้นโปรตีนที่สังเคราะห์ จาก Vir A จะกระตุ้น Vir G ซึ่งทำหน้าที่เป็น regulator

component สันนิษฐานว่าทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการลอกรหัส ในบริเวณ Vir region อื่น ๆ Vir D เกี่ยงข้องกับขั้นตอนแรก ในกระบวนการขนส่ง T-DNA Vir D1 มีคุณสมบัติ topoisomerase activity Vir D2 มีคุณสมบัติของ endonuclease activity ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ที่บริเวณ right border (RB) และ left border (LB) ของ T-DNA Vir C มีส่วนช่วย Vir D1 และ Vir D2 ซึ่งเท่ากับเป็นการส่งเสริมประสิทธิภาพในการส่ง T-strand ดังแสดงในภาพ Vir D2และ Vir E จะเข้าเกาะทางด้านปลาย 5′ ของ T- strand ที่ถูกตัดแล้ว เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ในกลุ่ม exonuclease และ endonuclease มาย่อยสลาย T-strand ในระหว่างที่มีการขนส่งผ่านจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช และทำให้ T-strand อยู่ในรูปเส้นตรง มีข้อสันนิษฐานว่า Vir B กำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำให้ผนังเซลล์ของ *Agrobacterium* มี ลักษณะคล้ายกับกระบวนการ conjugation ของแบคทีเรีย แต่การขนส่ง T-strand ผ่านเซลล์พืชและเยื่อหุ้มนิวเคลียสของพืชรวมไปถึงการเข้าแทรกของ T-strand ในโครโมโซมพืช จะเหมือนกับการบุกรุกของไวรัส ดังแสดงในภาพที่ 11.5



ภาพที่ 11.4 แสดง disarmed plasmid ที่ตัด T-DNA ออก แล้วใส่ antibiotic resistance gene แทน



ภาพที่ 11.5 แสดงกลไกการส่งถ่ายจีนจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืชที่จะนำมาทำการส่งถ่ายจีนนี้เป็น callus ของต้นถั่วส่วนต่าง ๆ คือ shoot, cotyledon, epicotyl, hypocotyl และ leaf และจากต้นอ่อนของต้นถั่วส่วนต่าง ๆ คือ cotyledon, epicotyl, hypocotyl และ leaf โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัด callus จากส่วนต่าง ๆ ประมาณ 4-5 ชิ้น และตัดส่วนต่าง ๆ ของต้นอ่อนให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 4-5 ชิ้น และตัดส่วนต่าง ๆ ให้เกิดบาดแผล

2. เตรียม *Agrobacterium* โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี antibiotic แล้วใส่ในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. นำ *Agrobacterium* 1 ml ไปปั่นเหวี่ยง ที่ 1,800 g เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอาส่วนของเหลวทิ้ง ละลานตะกอนแบคทีเรียด้วยอาหารเหลวสูตร MS 1 ml

4. ผสมสารละลาย *Agrobacterium* กับอาหารเหลวที่จะใช้เลี้ยงต้นถั่วให้ได้ความเข้มข้นประมาณ $2X10^{7} - 3X10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5. นำส่วนของ callus และต้นสดที่ตัดไว้จุ่มลง ในสารละลายอาหารเหลวที่มีเชื้อ

Agrobacterium เป็นเวลา 10 นาที

6. ย้ายส่วนของ callus และต้นสด มาวางบนกระดาษที่ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปวางในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.7% เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง1,500 ลักซ์ เวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7. ย้ายส่วนใบมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ที่เติม antibiotic เพื่อทำจัด *Agrobacterium* และ selecting agent เช่น กานามัยซิน เพื่อคัดเลือกพืชที่ได้รับจีนที่ส่งถ่ายเข้าไป สังเกตการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน

8. นำส่วนต่าง ๆ ของต้นถั่วมาตรวจสอบการแสดงออกของจีนโดย GUS assay

การแยกโพรโทพลาสต์จากโปรโตคร์อมของกล้วยไม้

โพรโทพลาสต์ คือ เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ที่ไม่มีผนังเซลล์ มีเพียงเซลล์เมมเบรนที่หุ้มนิวเคลียสและไซโทพลาซึมไว้ เนื่องจากโพรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ดังนั้นจึงทำให้สะดวกต่อการไม่ยีนหรือสารพันธุกรรมที่เราสนใจเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้เกิดพันธุ์ใหม่ตามที่ต้องการ

ปี 1982 เริ่มมีการใช้วิธีกลในการแยกโพรโทพลาสต์ โดย Klercher แต่มประสบความสำเร็จเพราะมีโพรโทพลาสต์ออกมาน้อย Cocking (1960) ได้ทดลองใช้เอนไซม์ cellulase แยกโพรโทพลาสต์จากส่วนปลายรากพืช

Takebe, Otsuki and Aoki (1986) ได้แยกโพรโตพลาสต์แบบวิธีกลและใช้เอนไซม์ร่วมด้วยทำให้สามารถแยกโพรโทพลาสต์จากยาสูบได้จำนวนมาก แต่มีปัญหาคือไม่สามารถเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ให้เจริญเป็นแคลลัสได้ และในปี 1986 Takebe, Labib and Melckers ได้เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบยาสูบจนสามารถ regenerate เป็นต้นได้เป็นครั้งแรก

วิธีการแยกโพรโตพลาสต์ ทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีกล (mechanical method)

เป็นวิธีการแรกที่มนุษย์ใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อของพืชโดยเอาเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง (hypertonic solution) น้ำในเซลล์พืชจะถูกดึงออกมาภายนอกทำให้โพรโทพลาสต์หดตัวลงคือเซลล์เกิด plasmolysis ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์จึงแยกออกจากผนังเซลล์ แล้วตัดเนื้อเยื่อพืชเป็นชิ้นบาง ๆแล้วนำไปแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อย (hypotonic solution) โพรโทพลาสต์ จะพองตัวและหลุดออกมา

2. วิธีใช้เอนไซม์ (enzymatic method)

เป็นวิธีที่สามารถแยกโพรโทพลาสต์ได้สมบูรณ์และมีปริมาณมาก โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเพคติเนส (pectinase) มาย่อยสลายผนังเซลล์จะได้ส่วนที่เหลือเป็นโพรโทพลาสต์

ขั้นตอนการแยกโพรโทพลาสต์

นำโปรโตคร์อมกล้วยไม้มาย่อยโดยใช้เอนไซม์ pectinase ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยสารประกอบเพคตินและสารประกอบที่เชื่อมติดกันให้แยกออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ย่อยบนเครื่องเขย่าเบา ๆ เมื่อเซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แล้วจึงใช้เอนไซม์ cellulase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยผนังเซลล์ออกจนได้ โพรโทพลาสต์

วิธีการเลี้ยงโพรโทพลาสต์

1. เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารแข็ง

1.1 Plating method

1.2 Feeder layer

2. เลี้ยงในอาหารเหลว

2.1 suspension or drop culture

2.2 micro-drop culture

2.3 microchamber techniqe

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวของโพรโทพลาสต์

1. ความเข้มข้นของโพรโทพลาสต์ ควรมีความเข้มข้น $5X10^{4}$-10^{5} โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร
2. การที่เซลล์โพรโทพลาสต์สร้างผนังเซลล์เร็วทำให้เป็นอุปสรรคในการรวมกันของโพรโทพลาสต์
3. การเก็บโพรโทพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหาร ควรเก็บโพรโทพลาสต์ที่แยกใหม่ ๆ ในที่ ๆ มีแสงสลัว เพราะถ้าได้รับแสงทันทีโพรโทพลาสต์อาจตายได้
4. อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงโพรโทพลาสต์คือ 25-29 องศาเซลเซียส

พันธุวิศวกรรมของเมล็ดพืชที่เก็บสะสมโปรตีน

ในช่วงที่มีการพัฒนาการของเมล็ดนั้น พืชส่วนใหญ่มีการสะสมสารหรืออาหารที่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาโบลิซึมเพื่อใช้ในการงอกในช่วงแรกของต้นอ่อน ซึ่งพลังงานเหล่านี้จะอยู่ในรูปของสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรต (แป้ง) และไขมัน ส่วนในเมล็ดที่มีสารประกอบพวกโปรตีนจะสะสมในรูปของธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งมนุษย์มีการใช้ประโยชน์จากเมล็ดโดยการหมักเพื่อให้ได้ อัลกอฮอล์ เช่น จากข้าวโพด และโปรตีนจากถั่วเหลือง เป็นต้น เมล็ดพันธุ์พืชไร่ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต และถั่วเหลือง ส่วนใหญ่นิยมปลูกจากเมล็ด ในด้านอุตสาหกรรมการเกษตร ที่ต้องการคุณภาพเมล็ดเพิ่มขึ้น ระหว่างศตวรรษที่ผ่านมา นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ปับปรุงพันธุ์พืชใหม่ ๆ ที่มีสารสะสมในเมล็ดมากกว่าแต่ก่อน ซึ่งไม่เพียงแต่เพิ่มปริมาณของแป้ง ไขมัน และโปรตีนเท่านั้น แต่มีการปรับปรุงให้มีกรดไลโนเลอิก ในเมล็ดถั่วเหลืองลดลง เพื่อให้มีกลิ่นที่น่าพอใจยิ่งขึ้น

การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตและไขมัน รวมทั้งสารประกอบอื่น ๆ โดยนำวิธีทางพันธุวิศวกรรมช่วย ในการเพิ่มประสิทธิภาพได้ เช่นในกิจกรรม หนึ่งหรือสองเอนไซม์ แต่ข้อจำกัดคือไม่มีความสมดุลของธาตุคาร์บอนในเมล็ด ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ตามธรรมชาติจะเหมาะสมกว่าในด้านการพัฒนาให้เมล็ดสะสมคาร์โบไฮเดรตและไขมัน

การดัดต่อยีนโดยตรงเพื่อต้องการเพิ่มคุณภาพเมล็ด เป็นสิ่งที่สำคัญ ในเมล็ดที่สะสมโปรตีนนั้นมักจะมีการขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นตัวใดตัวหนึ่งไป ในธัญพืชจะมีกรดอะ

มิโน ชนิด Lysine และ Tryptophan น้อย ส่วนพืชตระกูลถั่ว มักจะขาด ธาตุซัลเฟอร์ Methionine และ Cystein ในช่วงที่มีก่รพัฒนาด้านเศรษฐกิจจะมีความต้องการเพิ่มปริมาณสารอาหารในเมล็ดให้มากขึ้น เช่นในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการผลิตข้าวโพดและถั่วเหลืองถึง 16 ล้านตันต่อปี เพื่อป้อนโรงงานอุตสาหกรรม และเก็บไว้บริโภค

นักปรับปรุงพันธุ์มีข้อจำกัดในด้านการส่งถ่ายยีนเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้มีระดับสูงในเมล็ดพืช แต่พบว่ายีนไม่มีการแสดงออกในพืชเหล่านั้นได้ แม้จะเกิดอุปสรรคขึ้น แต่ก็ประสบความสำเร็จในการสกัด DNA สายผสมได้ และส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในหลอดทดลองเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนแทรกอยู่ด้วย โดยมีการทดลองในข้าวโพดและถั่วเหลือง เมล็ดที่สะสมโปรตีนนี้มีโครงสร้างและตำแหน่งที่เฉพาะซึ่งอยู่ภายในเซลล์เมล็ด ซึ่งสามารถดัดแปลงโดยไม่ทำให้โครงสร้างเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงไป

การจัดกลุ่มเมล็ดที่เก็บสะสมโปรตีน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะอยู่ในรูปเป็นเยื่อบางเรียกว่า protein bodies เมื่อเมล็ดงอกปริมาณโปรตีนจะลดลง โดยเมล็ดใช้พลังงานจากธาตุ N, C และ S เพื่อการเจริญในระยะแรก ๆ โปรตีนที่ละลายน้ำได้มีชื่อเรียกว่า albumins และสามารถละลายในสารละลายของเกลือได้ ถ้าไม่ละลายน้ำอยู่ในรูปของ glubulins ละลายในอัลกอฮอล์เรียกว่า prolamins หรือละลายในสารละลายที่เป็นกรดหรือเบสได้เรียกว่า glutelins

อธิบายคำศัพท์บางคำทางชีวโมเลกุล

adapter

โมเลกุลดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น ประกอบด้วยส่วนปลายด้านหนึ่งเป็นสายเดี่ยวที่เป็นคู่สมกับปลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง

agar

โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลชนิดหนึ่งใช้สำหรับทำให้อาหารแข็งตัว

agarose

โพลิเมอร์ของดีกาแลกโทสสลับกับ 3,6 แอนไฮโดรกาแลกโทส แยกมาจากอะการ์อีกทีหนึ่งใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

Agrobacterium tumefaciens

แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดปุ่มปมขึ้นในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด โดยแบคทีเรียจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์ที่ตายหรือมีบาดแผลเท่านั้น และแบคทีเรียจะส่งที่เป็นพลาสมิดเข้าไปในเซลล์พืช

Angstrom unit

หน่วยความยาวมีค่าเท่ากับ 10^{-4} ไมครอน หรือ 10^{-10} เมตร ใช้สัญลักษณ์ A° ตั้งชื่อเพื่อเป็นเกียรติแก่นักฟิสิกส์ชาวสวีเดน Anders Janas Anstrom

antibody

โปรตีนที่ผลิตขึ้นโดยเซลล์น้ำเหลือง เพื่อตอบสนองต่อสารแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ที่เรียกว่าแอนติเจน และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับสารดังกล่าวได้

anticoding strand

สายหนึ่งของดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่ใช้เป็นต้นแบบในการลอกรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ มีเบสเป็นคู่สมกับอาร์เอ็นเอที่ได้ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า template strand

antigen

สารแปลกปลอม ซึ่งเมื่อนำเข้าสู่สัตว์มีกระดูกสันหลัง จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์แอนติบอดีที่จำเพาะต่อกัน

antisense RNA

โมเลกุลของอาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ mRNA ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์โดยทั่วไป

antitermination factor

โปรตีนซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้เอนไซม์ RNA polymerase ละเลยสัญญาณการหยุดลอกรหัส ที่ตำแหน่งหนึ่งบนโมเลกุลของดีเอ็นเอ

autoradiography

เทคนิคการหาตำแหน่งของโมเลกุลที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี โดยวางฟิล์มเอกซ์เรย์บนตัวอย่างที่เตรียมไว้เป็นเวลาหลายชั่วโมงจนถึงหลายวัน จะปรากฏเป็นจุดสีดำบนฟิล์มตรงตำแหน่งที่สนใจ

autotroph

สิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างสารโมเลกุลใหญ่จากสารอนินทรีย์ง่าย ๆ ใช้สำหรับดำรงชีวิตได้ เช่น แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ ได้แก่ พืช และแบคทีเรียบางชนิด

auxotroph

จุลินทรีย์พันธุ์กลายซึ่งไม่สามารถสร้างสารบางชนิดได้ด้วยตัวเอง จะเจริญเติบโตได้ในสารอาหารที่เติมสารดังกล่าวแล้วเท่านั้น

bacteriophage

ไวรัสของแบคทีเรียเรียกสั้น ๆ ว่าฝาจ ตัวอย่างเช่น P1,P2 แลมบ์ดา เป็นไวรัสของแบคทีเรีย *E.coli*

biotin

วิตามินชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็นแฟคเตอร์ร่วมของเอนไซม์บางชนิด สามารถจับตัวได้ดีกับสารปฏิชีวนะ streptavidin

biotinylated DNA

DNA probe ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน

cDNA

ดีเอ็นเอคู่สมซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบ ใช้เอนไซม์ reverse transcriptase

cDNA library

แหล่งรวมของ cDNA ที่เป็นตัวแทนของ mRNA ทุกชนิดที่สร้างขึ้นจากเซลล์หรืออวัยวะหนึ่งของสิ่งมีชีวิต ที่ต่อเชื่อมอยู่กับเวคเตอร์ เช่น พลาสมิด หรือ ฝาจแลมบ์ดา

เนื่องจากยีนทุกยีนในสิ่งมีชีวิตไม่ได้มีการแสดงออกในทุก ๆ เซลล์ cDNA library จึงเป็นแหล่งรวมของยีนที่มีการแสดงออกในส่วนนั้นเท่านั้น

chromosome walking

วิธีแยกหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอซ้อนต่อเนื่องกันเป็นลำดับ เพื่อจะหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมที่ยาวมากเกินกว่าที่จะบรรจุไว้ในเวคเตอร์เพียงโมเลกุลเดียวได้ อาจใช้เทคนิคนี้ในการหายีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่มี probe สำหรับติดตามได้ แต่ทราบว่ายีนดังกล่าวนี้แยกตัวไปพร้อมกับชิ้นดีเอ็นเอชิ้นหนึ่งที่แยกไว้แล้ว ใช้ดีเอ็นเอที่แยกได้นี้เป็น probe เพื่อตรวจหาโคลนที่มีดีเอ็นเอซ้อนกันกับส่วนของ probe จากgeomic library แล้วแยกดีเอ็นเอจากโคลนที่ได้ใหม่ ทำแผนที่โดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เลือกใช้ส่วนปลายที่อยู่ไกลจาก probe ชิ้นแรกเป็น probe ต่อไป เพื่อตรวจหาโคลนที่มีส่วนของดีเอ็นเอซ้อนกันยาวออกไปเรื่อย ๆ ทั้ง 2 ทิศทาง จนกว่าจะถึงยีนที่สนใจ

clone

ถ้าเป็นคำนามหมายถึงกลุ่มเซลล์ที่กำเนิดมาจากเซลล์เดียวกัน ดังนั้นจึงมียีนที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน เมื่อเป็นคำกริยาหมายถึงการสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมหรือยีนเหมือนกันหรือเป็นการขยายเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มียีนที่ต้องการให้มีจำนวนมาก เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณยีนนั้น ๆ ให้มากขึ้นด้วย

coat protein

โปรตีนโครงสร้างที่ห่อหุ้มอยู่นอกอนุภาคของไวรัส

coding strand

สายหนึ่งของดีเอ็นเอเกลียวคู่ ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับ mRNA ยกเว้น T แทนที่ด้วย U ในอาร์เอ็นเอ

colony hybridization

เทคนิคที่ใช้แยกแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจสอดแทรกอยู่ วิธีทำคือถ่ายโคโลนีของแบคทีเรียจากจานเลี้ยงเชื้อไปสู่แผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วจึงนำแผ่นฟิลเตอร์ไป hybridize กับ probe ที่ติดฉลากไว้แล้วด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี เพื่อหาตำแหน่งของโคโลนีที่มียีนที่สนใจต่อไป

competence

สภาพของแบคทีเรียช่วงที่เซลล์สามารถจับกับดีเอ็นเอภายนอก และดูดเข้าไปภายในเซลล์ได้ คือทำให้เกิด transfromation นั่นเอง

concatemer

โครงสร้างที่เกิดจากการเชื่อมต่อโมเลกุลของสารที่มีหลาย ๆ หน่วย โดยต่อไปในทิศทางเดียวกันตลอด เช่น ดีเอ็นเอจากจีโนมของฝาจแลมบ์ดาที่ต่อกันเป็นสายยาวหลายหน่วยในขณะที่มีการจำลองโมเลกุล

concensus sequence

ลำดับการเรียงตัวของเบสภายในดีเอ็นเอที่พบบ่อยในบริเวณหนึ่ง ๆ เมื่อเปรียบเทียบยีนหลายยีนหรือยีนที่มาจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

cosmid

พลาสมิดที่มี cos site ของฝาจแลมบ์ดาอยู่ด้วย เพื่อให้สามารถสอดใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่และบรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจแลมบ์ดาได้ในหลอดทดลอง

dalton

หน่วยของสารมีค่าเท่ากับมวลของอะตอมของไฮโดรเจน (1.67×10^{-24} กรัม)

denaturation

การสูญเสียโครงสร้างของธรรมชาติของสารโมเลกุลใหญ่ โดยความร้อน pH หรือสารเคมีบางชนิด มักจะทำให้สูญเสียความสามารถในกิจกรรมต่าง ๆ ไปด้วย เช่น ดีเอ็นเอเมื่อเกิดเสียสภาพหมายถึงการเปลี่ยนจากเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว

DNA cloning

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจำเพาะให้มีปริมาณมากขึ้น โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวอยู่

DNA library

แหล่งรวมของชิ้นดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ต่ออยู่กับเวคเตอร์ และถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับที่เหมาะสม และมีขนาดเล็กกว่า genomic library

DNA ligase

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ โดยสร้างพันธะฟอสโฟไดแอสเทอร์ระหว่างดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นนั้น

electrophoresis

วิธีแยกสารโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสารละลายในสนามไฟฟ้า โดยทั่วไปมักจะมีตัวกลางเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของโมเลกุลของสาร เช่น กระดาษกรอง แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท เจลที่ทำจากอะการ์ อะกาโรส หรือโพลีอะครีลาไมด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้า ขนาด และรูปทรงของโมเลกุล

electroporation

เทคนิคการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่อง เพื่อให้ยอมรับชิ้นดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปได้ดีขึ้น โดยใช้กระแสไฟฟ้าเป็นจังหวะที่เหมาะสมใช้ได้กับเซลล์สัตว์ โพรโทพลาสต์ของพืช หรือเซลล์แบคทีเรียก็ได้

enhancer

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่งเสริมกิจกรรมการลอกรหัสของยีนที่อยู่ใกล้กันนั้น enhancer จะทำงานโดยเพิ่ม

11.11 บทสรุปกลไกการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช

1. ขั้นตอนการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืชมีขั้นตอนดังนี้พืชที่เกิดบาดแผลสังเคราะห์สาร acetosyringone (AS) ซึ่งเป็นสารพวกฟีโนลิค (phenolic compound) และปลดปล่อยออกมาจากบริเวณที่มีบาดแผล

2. สาร phenolic compound ไปกระตุ้นผลิตผลของยีน chv ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* ทำให้ *Agrobacterium* เข้าไปเกาะกับเซลล์พืชตรงบริเวณที่มีบาดแผล

3. โปรตีนจากยีน Vir A ทำหน้าที่เป็น chemoreceptor จดจำ AS และไปกระตุ้นให้ Vir G ทำงาน

4. โปรตีนจากยีน Vir G ไปกระตุ้น Vir อื่น ๆ ให้ทำงานและในที่สุดกระตุ้น Vir D ให้ทำงาน

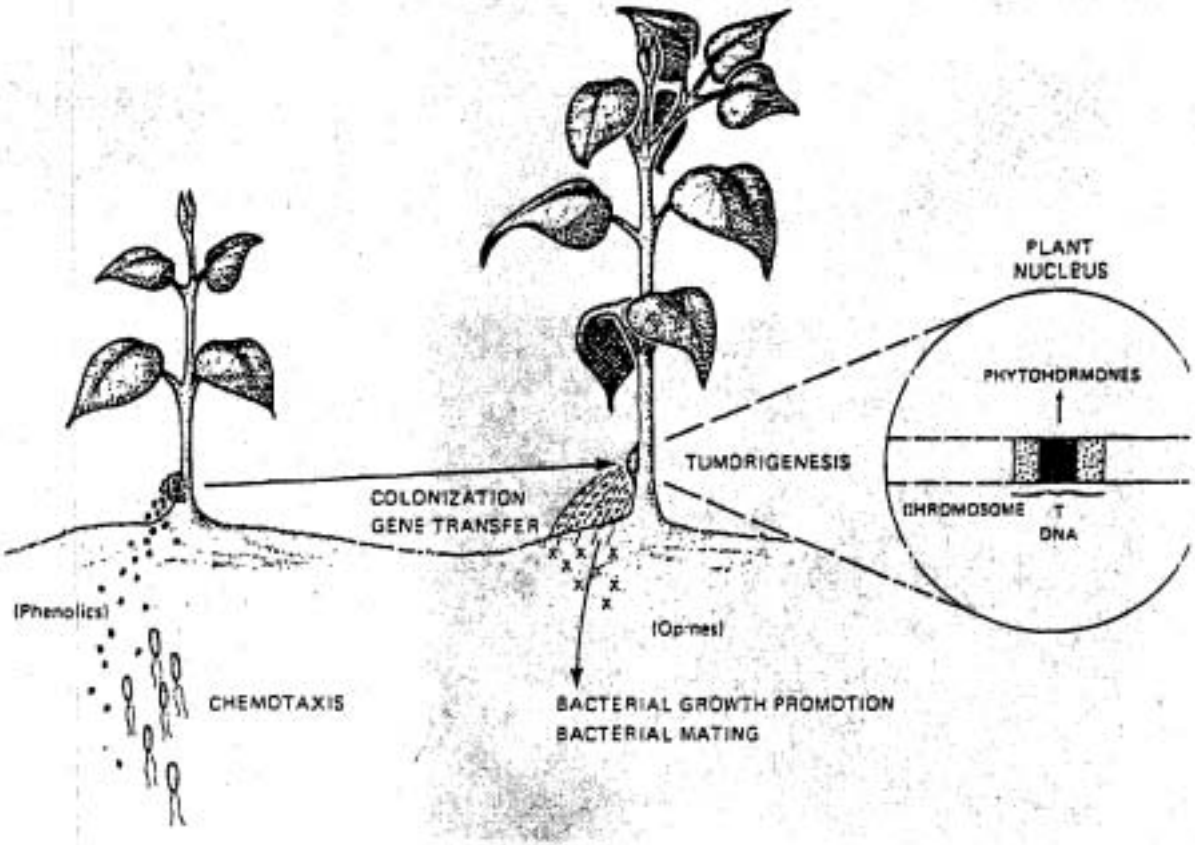
5.โปรตีนจากยีน Vir D ซึ่งเป็นเอนไซม์ endonuclease ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่งของ RB และ LB

6. เกิด T-DNA สายเดี่ยว หรือ t- strand

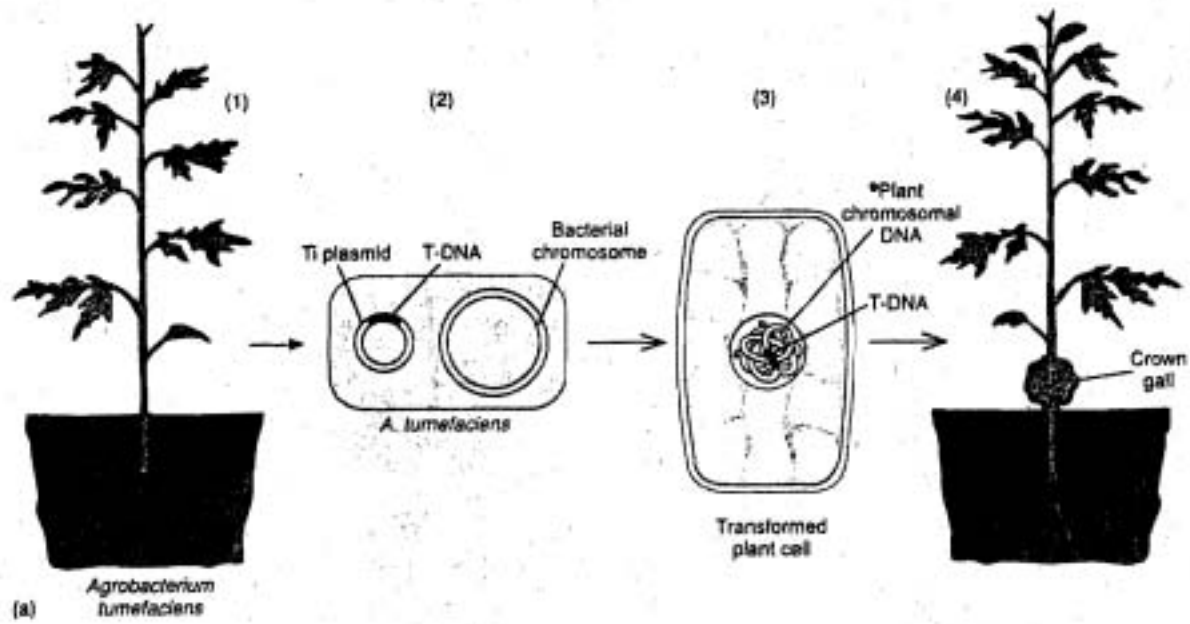
7. Vir gene จะทำหน้าที่ส่ง t-strand เข้าสู่เซลล์พืชซึ่งจะไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช

8. เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ในส่วนของ T-DNA ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากมายแล้วกลายสภาพเป็นเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปม (crown gall) และมีการผลิตสารออกโทปีนออกมาก

9. สารออกโทปีนจะไปเหนี่ยวนำให้เกิดการลอกรหัสของยีนทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เพื่อใช้สารนี้เป็นแหล่งพลังงาน

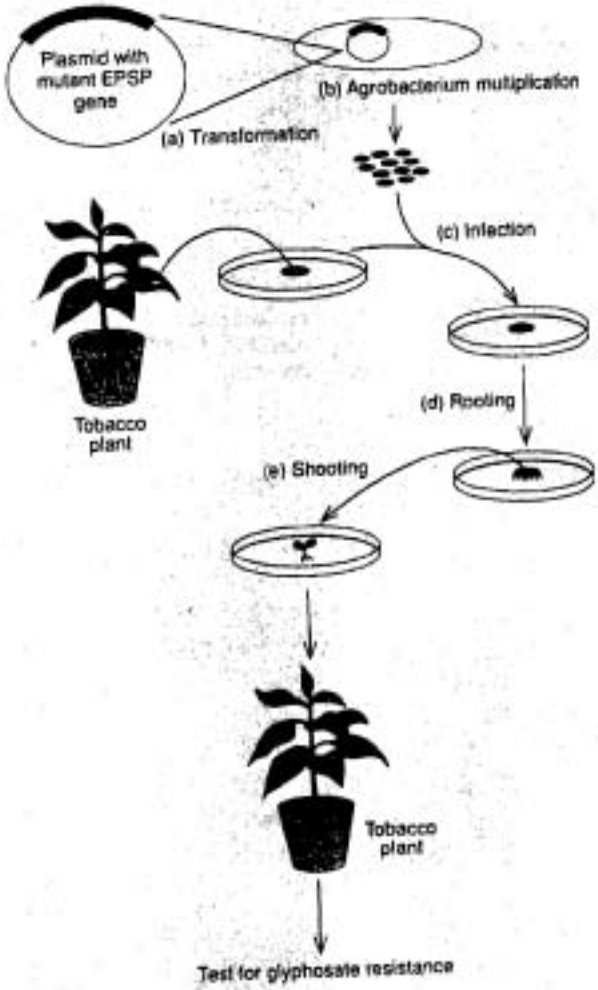


ภาพที่ 11.6 แสดงขั้นตอนที่ *Agrobacterium* T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)

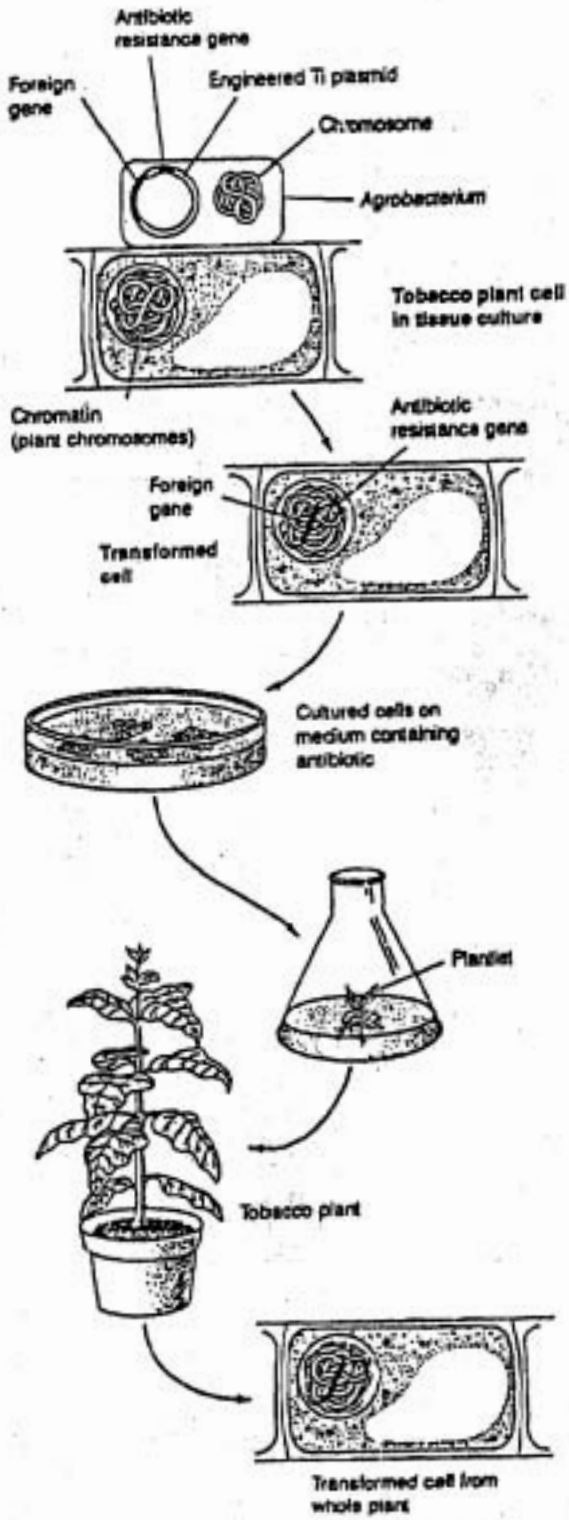


(b)

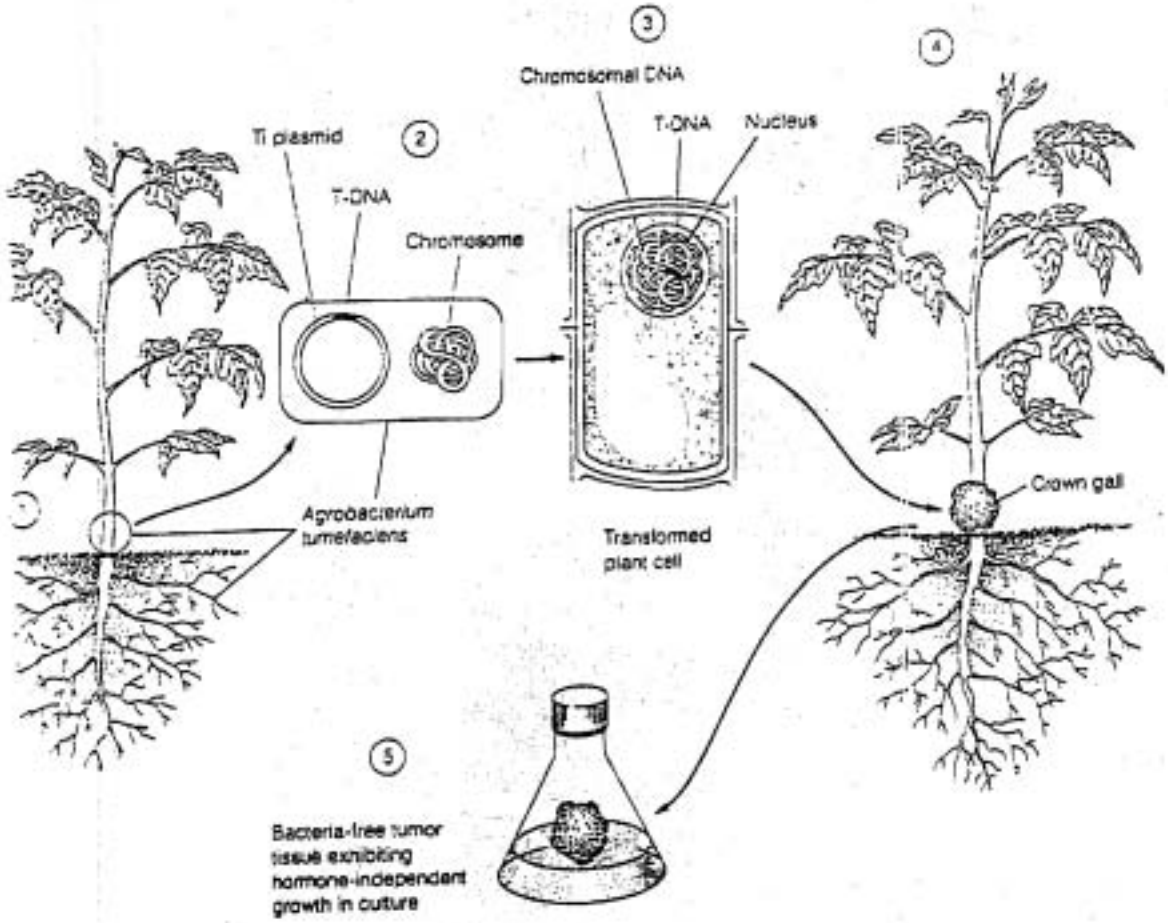
ภาพที่ 11.7 การเกิดปมตามธรรมชาติในพืช (a) ขั้นตอนการเกิด Crow gall
(b) ต้นยาสูบเกิดปมที่บริเวณยอด



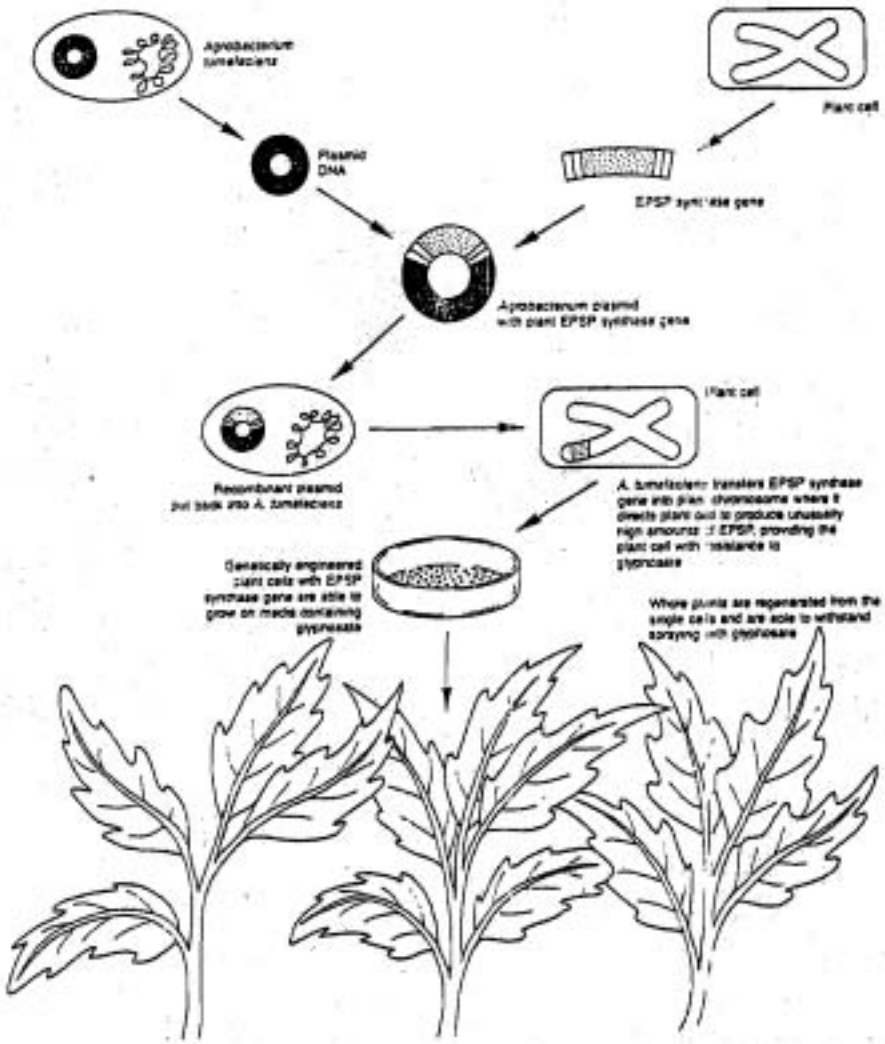
ภาพที่ 11.8 ขั้นตอนการถ่ายยีน EPSP สู่ต้นยาสูบเพื่อให้ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช (glyphosate)



ภาพที่ 11.9 แสดงขั้นตอนการสร้างเวคเตอร์ที่มียีนที่สนใจใน *Agrobacterium*
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)

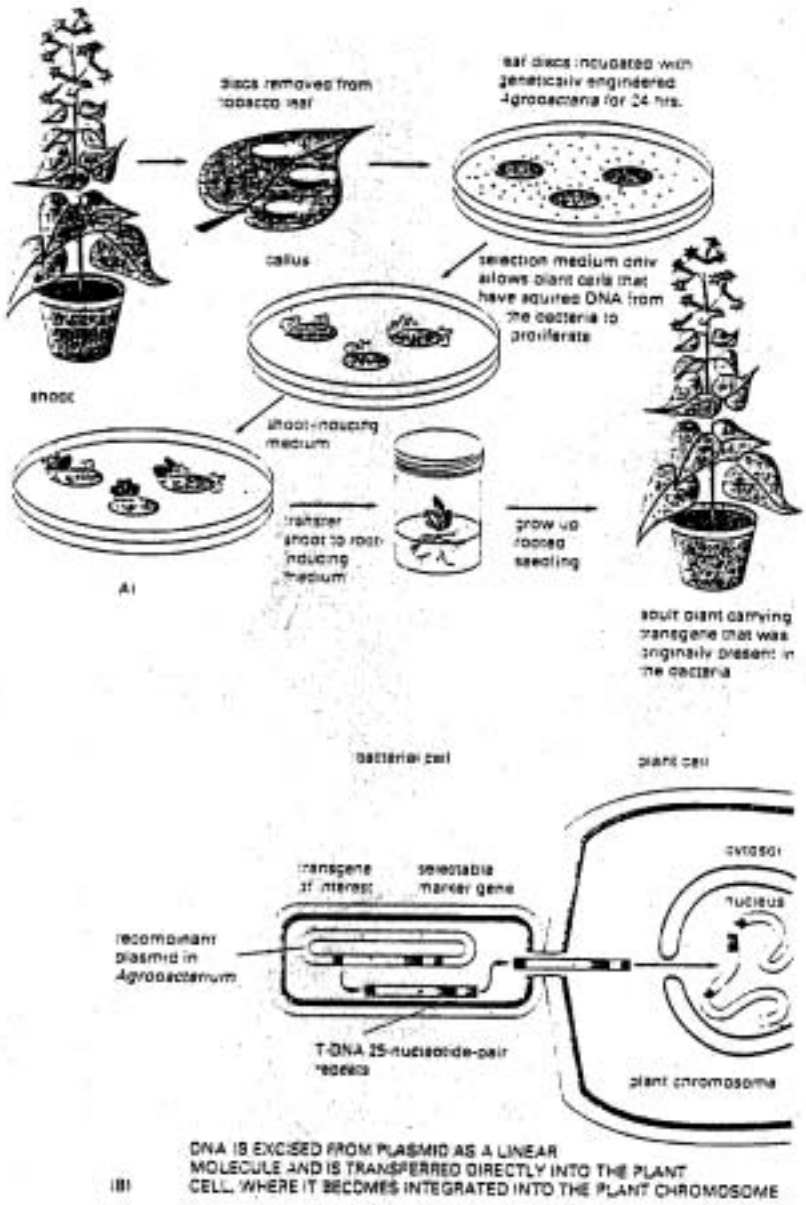


ภาพที่ 11.10 สรุปกระบวนการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *Agrobacterium*
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)

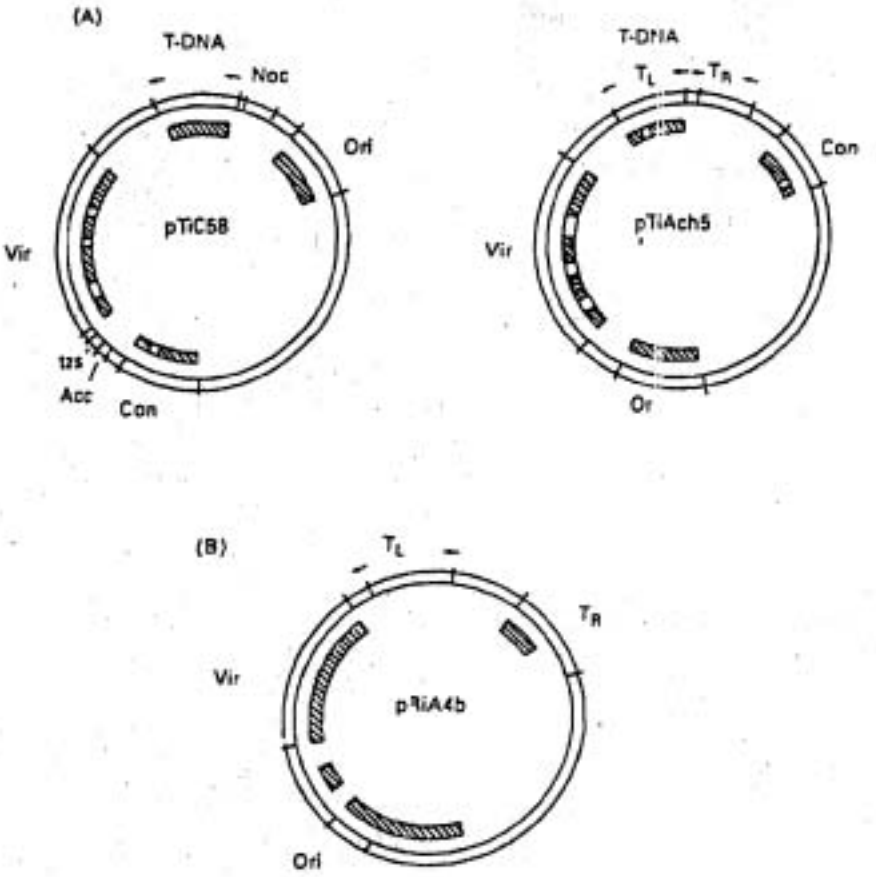


ภาพที่ 11.11 แสดงการสร้างเวคเตอร์ที่จะนำยีน EPSP synthase เข้าสู่พืช

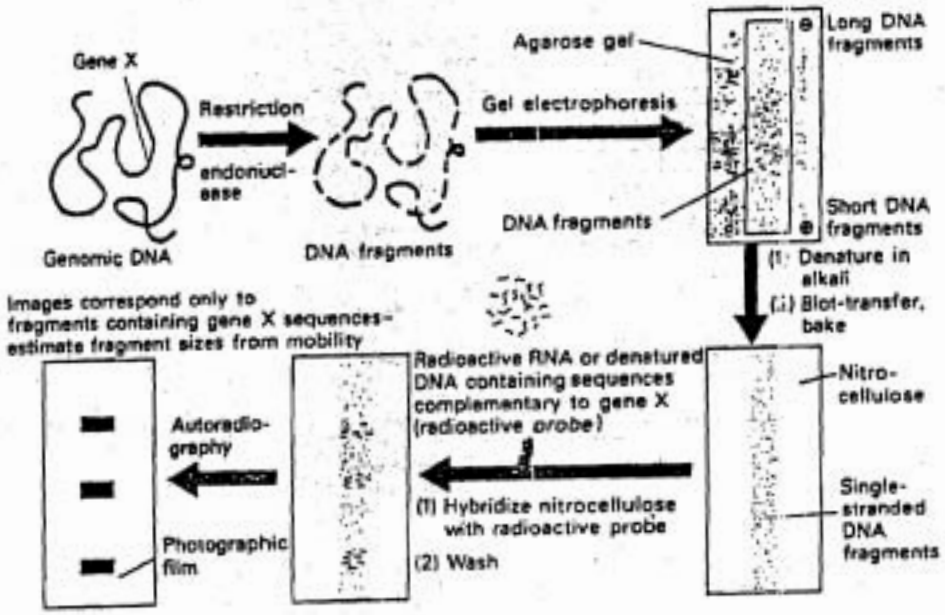
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)



ภาพที่ 11.12 ขั้นตอนการส่งถ่ายยีนสู่พืชเพื่อให้เกิดพืชแปลงพันธุ์

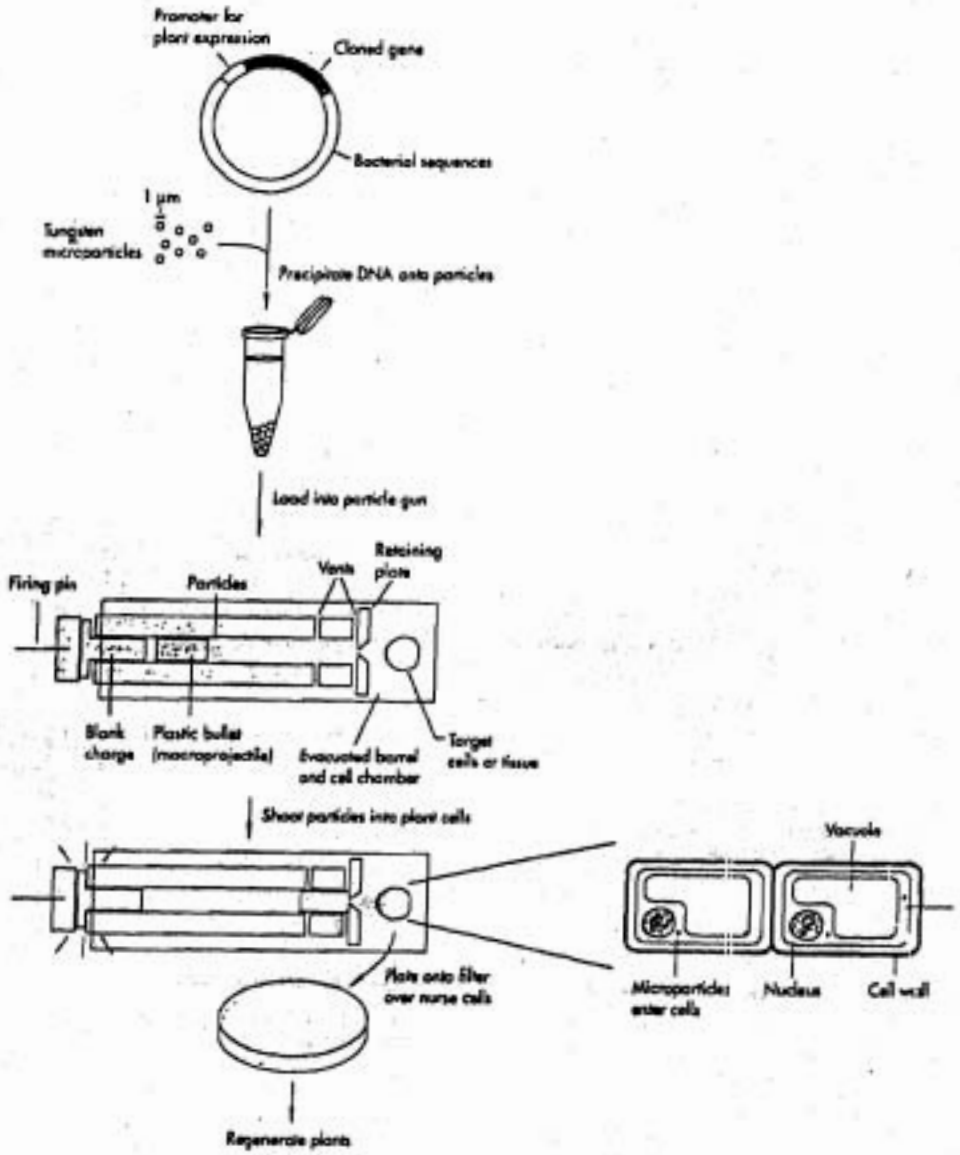


ภาพที่ 11.13 แสดงแผนที่ (A) Ti plasmid (B) Ri plasmid

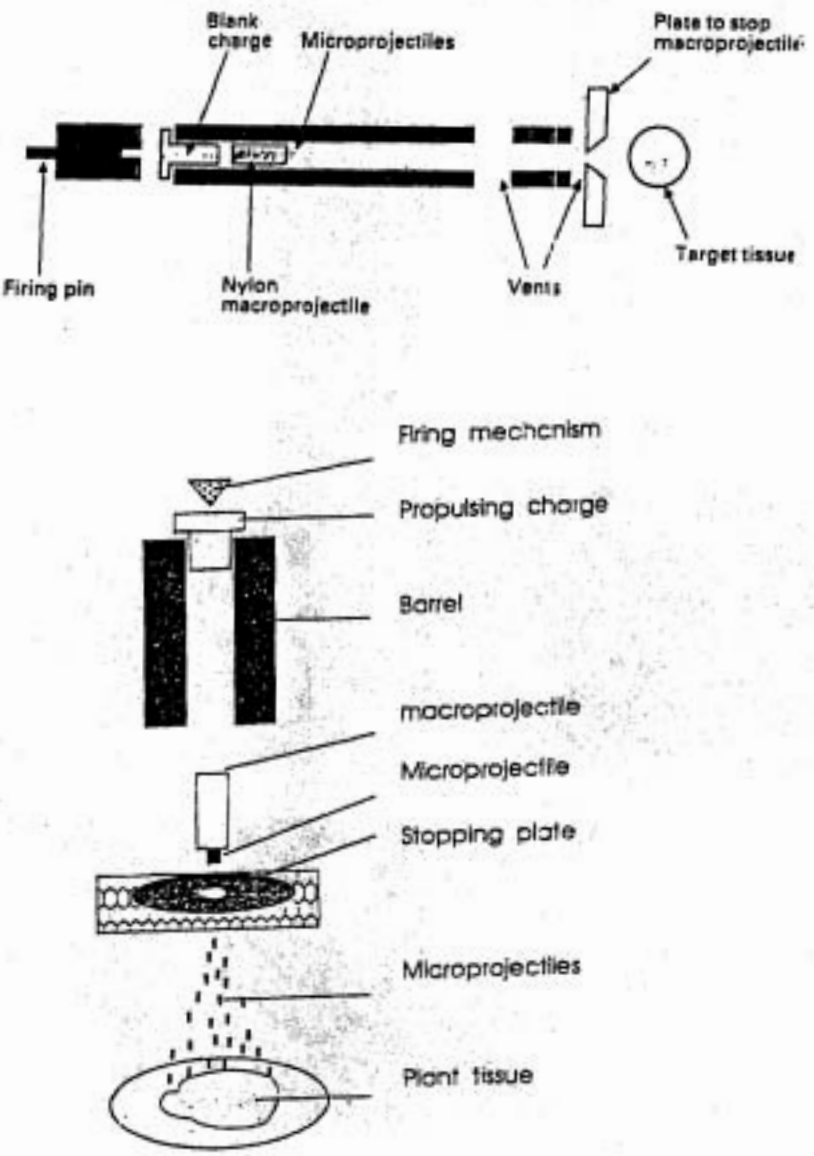


ภาพที่ 11.14 แสดงการวิธีการทำ southern bloting

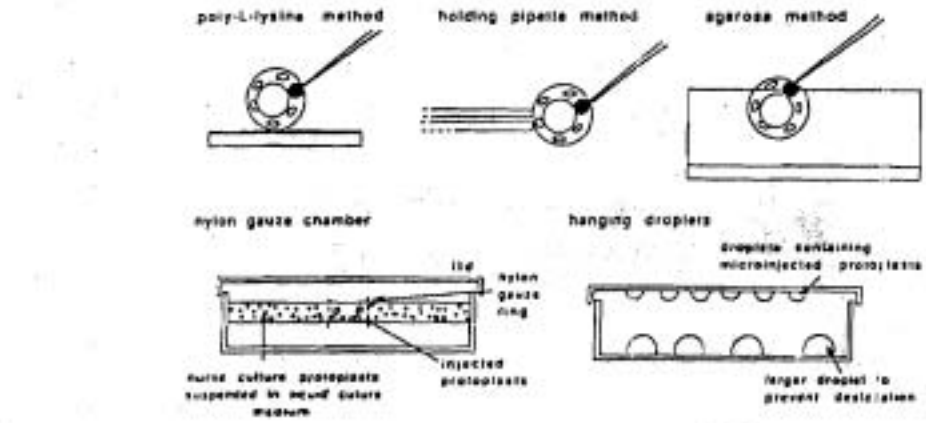
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)

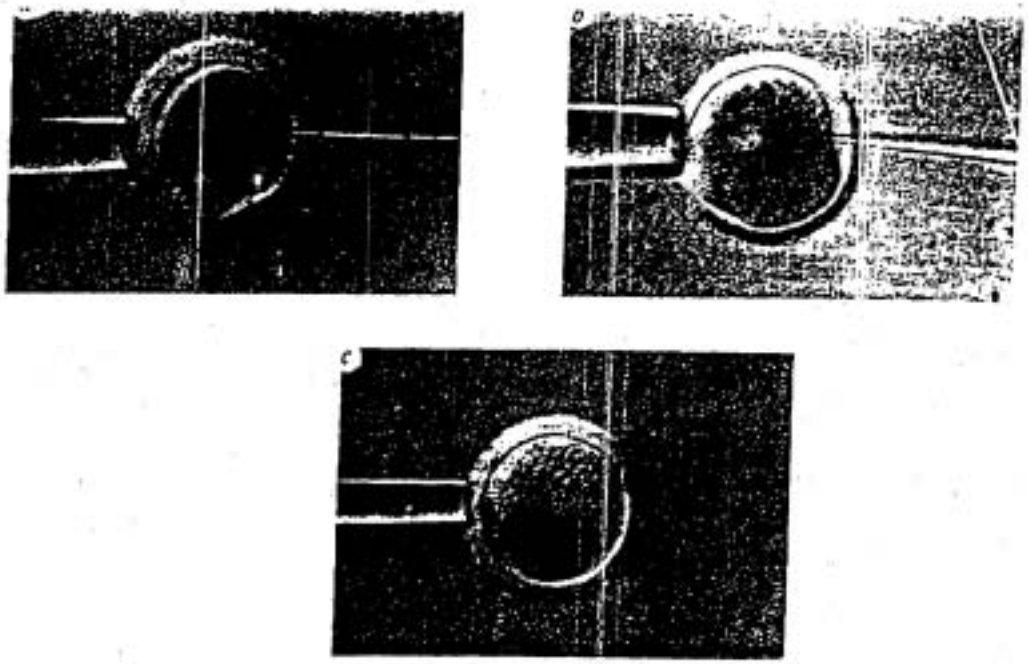


ภาพที่ 11.15 การส่งถ่ายยีนวิธีตรงโดยใช้ microprojectile bombartment
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)



ภาพที่ 11.16 การส่งถ่ายยีนวิธีตรงโดยใช้ microprojectile
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)





ภาพที่ 11.17 การส่งถ่ายยีนวิธีตรงโดยใช้ microinjection
(ดัดแปลงจาก สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)

แบบประเมินผลท้ายบท

จงเลือกคำตอบที่ถูกต้องเพียงข้อเดียว

1. พืชหรือสัตว์ที่ได้จากการดัดแปลงหรือตัดต่อสารพันธุกรรมเรียกว่า ?

   1) GMOs 2) DMOs

   3) GMS 4) GTS

2.วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชที่นิยมใช้กันในปัจจุบันคือข้อใด ?

   1) selection 2) hybridization

   3) combination 4) ข้อ 1 และข้อ 2 ถูกต้อง

3. พาหะที่นำยีนเข้าสู่เซลล์พืชนั้นนิยมใช้สิ่งมีชีวิตชนิดใด ?

   1) แบคทีเรีย 2) พืช

   3) สัตว์ 4) โปรโตซัว

4. เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดลำดับเบสคือ ?

   1) ligase enzyme

   2) restriction enzyme

   3) recombinant

   4) complementary

5. ในปัจจุบันนี้พืชชนิดใดที่ได้ทำการดัดแต่งสารพันธุกรรมสำเร็จแล้ว

   1) ยาสูบต้านทานไวรัส TMV

   2) มะเขือเทศต้านทานสาร glyphosate

   3) พิทูเนีย

   4) ถูกต้องทุกข้อ

เฉลยแบบประเมินผล

1. 1) 2. 4) 3. 1) 4. 2) 5. 4)

****