

## ปฏิบัติการ บทที่ 9

### การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

การปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันมักนิยมใช้เทคนิคการถ่ายฝากยีนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆของพืชได้ เช่น ใบ ราก กิ่ง ลำต้น ดอก ละอองเกสร คัพภะ จนถึงกลุ่มเซลล์ และโปรโตพลาสต์ (เซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์) จนเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเกือบทุกชิ้นส่วนของต้นพืชสามารถนำมาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส (callus) หรือกลุ่มเซลล์ เพื่อเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และเกิดกระบวนการ organogenesis / embryogenesis จนกระทั่งเกิดเป็นต้นใหม่ (plantlet / regenerant) ดังนั้นจึงเรียกคุณสมบัติพิเศษเช่นนี้ในพืชว่า totipotency

สำหรับการถ่ายฝากยีนในพืชนั้นมีหลายวิธี เช่น การถ่ายฝากยีนโดยตรง (direct gene transfer) การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิง (biolistic technique) และการถ่ายฝากยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium) แต่ในการทดลองครั้งนี้จะเลือกวิธีการถ่ายฝากยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

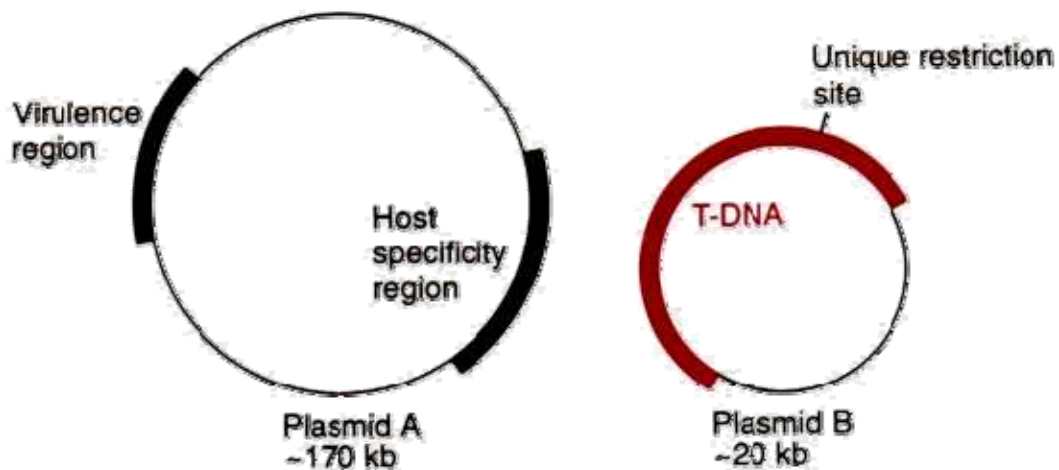
#### ลักษณะทั่วไปของอะโกรแบคทีเรีย

อะโกรแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) ซึ่งเรียก crown gall disease (รูปที่ 1) เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อจะเจริญได้รวดเร็วและโตได้ไม่จำกัดจนเกิดเป็นสภาพที่เรียกว่า แคลลัส และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ อะโกรแบคทีเรียที่นิยมใช้มักมีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ *Agrobacterium tumefaciens* ทำให้เกิดปุ่มปมบริเวณลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่ แต่ไม่สามารถทำให้เกิดปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในขณะที่ *Agrobacterium rhizogenes* ทำให้เกิดปุ่มปมบริเวณราก

รูปที่ 9.1 ปุ่มปมของพืชที่เกิดจากการบุกรุกของอโกรแบคทีเรีย

Agrobacterium ที่มีเวกเตอร์แบบ binary

อโกรแบคทีเรียจะมีพลาสมิดอยู่ 2 ขนาด คือ พลาสมิดขนาดเล็ก และพลาสมิด Ti ขนาดใหญ่ซึ่งมีส่วนของยีนที่เรียกว่า virulence gene (Vir gene) ทั้งหมด 6 ยีน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย้ายยีนที่ชื่อว่า T-DNA ซึ่งอยู่ในพลาสมิดขนาดเล็กของอโกรแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืช ดังนั้นหากต้องการให้ยีนที่สนใจถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช จึงจำเป็นต้องนำยีนดังกล่าวมาใส่ไว้ในส่วนที่เป็น T-DNA



รูปที่ 9.2 เวกเตอร์แบบ binary ของ Agrobacterium

หน้าที่ของ virulence gene ต่างๆ มีดังนี้

Vir A มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม และจดจำสารประกอบพวกฟีนอลิกที่ผลิตออกมาจากพืช และยีนนี้จะไปกระตุ้นยีน Vir G

Vir G มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม และเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่นๆในกลุ่ม

Vir D มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ DNA ที่บริเวณขวา และซ้ายของ T-DNA คือ right border (RB) และ left border (LB) ซึ่งมีผลให้เกิดการตัด T-DNA ออกจากพลาสมิด

Vir C มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และชนิดของพืชที่จะเข้าบุงกรุก แต่ยังไม่ทราบว่ามีการอย่างไร

Vir E เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่จับ DNA สายเดี่ยว เพื่อให้ T-DNA มีความคงตัวในระหว่าง และหลังจากที่มีการส่งถ่ายยีน

Vir B เป็นโปรตีนที่ไปจับตัวที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อเป็นช่องทางให้ T-DNA ผ่านไปยังเซลล์พืช

กลไกการย้ายยีนของ Agrobacterium

เมื่อพืชเกิดบาดแผลจะมีการหลั่งสารฟีนอลิก (phenolic) ออกมา ซึ่งสารนี้จะไปกระตุ้น vir gene ต่างๆที่อยู่ในพลาสมิด Ti ขนาดใหญ่ของอโกรแบคทีเรียม ส่งผลให้ T-DNA ถูกตัดออกจากพลาสมิดขนาดเล็กโดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก Vir D จากนั้นจะมีการถ่ายทอด T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชในรูปแบบ DNA สายเดี่ยว

### วิธีการทดลอง

- วิธีการย้ายยีนเข้าสู่ใบเลี้ยงของมะเขือเทศโดยใช้อโกรแบคทีเรียม (Qiu et al., 2007)

1. นำเมล็ดของมะเขือเทศมาทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล เป็นเวลา 30 วินาที
2. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 10 วินาที
3. แช่เมล็ดใน 1% สารละลายไฮโปคลอไรต์
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง

5. วางเมล็ดลงบนอาหารแข็งสูตร MSB5 ((M0404 lot 102K23323) Sigma Chemical Co.,) medium A (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชม. เป็นเวลา 4-5 วัน จนมีใบเลี้ยงงอกออกมาจากเมล็ด
6. ทำการตัดใบเลี้ยงออกมาวางบนอาหารแข็งสูตร MSB5 medium B แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยให้รับแสงเป็นเวลา 16 ชม. เป็นเวลา 1 คืน
7. หยดเชื้อ *Agrobacterium* ลงบนใบเลี้ยงให้ชุ่ม เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที
8. นำใบเลี้ยงจากข้อ 6 ไปวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ปลอดโรค เพื่อซับเชื้อ *Agrobacterium* ที่เป็นส่วนเกินออก
9. วางใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MSB5 medium B แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชม. เป็นเวลา 3 วัน
10. ย้ายใบเลี้ยงไปวางบนอาหารแข็งสูตร MSB5 medium C แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชม. เป็นเวลา 3 วัน
11. ย้ายใบเลี้ยงไปวางบนอาหารแข็งสูตร MSB5 medium D แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชม. เป็นเวลา 3 อาทิตย์
12. เปลี่ยนอาหารแข็งสูตร MSB5 medium D ทุกๆ 3 อาทิตย์ ในระยะเวลา 6-8 สัปดาห์

- วิธีการเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มี binary vector

1. เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 (ซึ่งประกอบด้วย พลาสมิดที่มียีน *nptII* ซึ่งต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ kanamycin และ Ti พลาสมิด) ในอาหารเหลวสูตร LB (ภาคผนวก ก) ที่มีสาร rifamicin ความเข้มข้น 30 mg/l และ kanamycin ความเข้มข้น 100 mg/l เป็นเวลา 1 คืน
2. เจือจางเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหารเหลวสูตร LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.2
3. ทำการปั่นตกตะกอนเชื้อ *Agrobacterium* ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ในหลอดขนาด 50 ml
4. ละลายตะกอนที่ได้ด้วยอาหารเหลวสูตร MSB5 medium B1 (ภาคผนวก ก)

## บันทึกผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....