การส่งถ่ายยีน Antisense ACC Oxidase สู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม (*Dendrobium delacourii* Guill) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวกลาง

Antisense ACC Oxidase Gene Transformation of *Dendrobium delacourii* Guill Protocorm Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

พรทิพย์ อติชาติ [1/]
Porntip Atichart [1/]

สุมนทิพย์ บุนนาค [2/]
Sumonthip Bunnag [2/]

ABSTRACT

The objectives of this research were to investigate the efficiency of transformation of *Dendrobium delacourii.* by using *Agrobacterium tumefaciens* with antisense ACC oxidase gene. The effect of cefotaxime on the growth of *Agrobacterium tumefaciens* which harboured the plasmid pCAMBIA 1305.1 containing antisense ACC oxidase gene, hptII gene as a selectable marker and Gus gene as a reporter gene were found that *A. tumefaciens* could grow on LB medium without cefotaxime and supplement with 25 mg/l. cefotaxime and could not grow on 50, 75, 100, 125, 150 and 175 mg/l. The culture of *Dendrobium delacourii* on VW medium supplement with 100, 200, 300, 400 and 500 mg/l., cefotaxime concentration, were found that *D. delacourii* protocorms could grow in every concentration and tolerate up tp 500 mg/l cefotaxime. The study of hygromycin concentration on the growth of *D. delacourii* was found that 10, 15, 20, 25 and 30 mg/l., hygromycin, orchid protocorms could not tolerate, the protocorms turned brown and could not grow. The genetic transformation of *D. delacourii* was mediated by *A. tumefaciens* and could be the optimal co-cultivation time was 20 minutes. The transformation protocorrms had Gus gene expression, shown by histochemical Gus assay.

Key-words: gene transformation, *Dendrobium delacouril*, cefotaxime, hygromycin, *Agrobacterium tumefaciens*

[1/] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

[1/] Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakam University, Kantarawichai district, Maha Sarakam province 44150

[2/] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

[2/] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Maueng district, Khon Kaen province 40000

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวกลางในการส่งถ่ายยีน การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1 ที่มียีน antisense ACC oxidase และมียีน hptII เป็นยีนเครื่องหมาย) ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24 ชม. พบว่ามีการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีโฟแทกซีมและที่มีซีโฟแทกซีม 25 มก./ล. เท่านั้น ที่ความเข้มข้น 50 75 100 125 150 และ 175 มก./ล. ไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้น การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 100- 500 มก./ล. พบว่าโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารสังเคราะห์ที่เติมซีโฟแทกซีมทุกระดับความเข้มข้น และสามารถเจริญเติบโตได้ในซีโฟแทกซีมความเข้มข้นสูงสุดที่ 500 มก./ล. และเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินในความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขาม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 10 15 20 25 และ 30 มก./ล. โปรโตคอร์มไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โปรโตคอร์มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซีด จากนั้นจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด และจากการบ่มโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามกับเชื้อ *Agrobacterium* คือ 20 นาที เนื้อเยื่อพืชมีการแสดงออกของยีน Gus จากการตรวจสอบด้วยวิธี Gus assay

คำหลัก: การส่งถ่ายยีน เอื้องมะขาม ซีโฟแทกซีม ไฮโกรมัยซิน *Agrobacterium tumefaciens*

คำนำ

การส่งถ่ายยีนสู่พืช (plant gene transfer) คือกระบวนการส่งถ่ายยีนที่ให้ความสนใจในการเข้าสู่พืช ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นยีนจากพืชเสมอไป อาจเป็นยีนจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็ได้ เช่น อาจเป็นยีนจากแบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ได้ทำให้มีการสอดแทรกของยีนเข้าไปในจีโนมของพืช ซึ่งการสอดแทรกของยีนต้องมีความเสถียร โดยสามารถผ่านขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสและไมโอซีส (Walden, 1989 อ้างโดย สุมนทิพย์, 2540) ซึ่งพืชที่ได้รับยีนเข้าไปเรียกว่า พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plants) ในการนำยีนที่สนใจเข้าสู่พืช ต้องมีพาหะในการที่จะนำยีนที่สนใจเข้าสู่พืช พาหะที่ใช้ส่งถ่ายยีนปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น พลาสมิดในแบคทีเรียหลายชนิด ดีเอ็นเอของ Lamda phage, Yeast artificial chromosome (YAC) ดีเอ็นเอของ virus หรือ cosmid เป็นต้น

การส่งถ่ายยีนมีทั้งการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีตรง โดยการใช้เครื่องยิงอนุภาคดีเอ็นเอเข้าสู่พืชโดยตรง และการส่งถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวกลางในการส่งถ่ายยีน ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลาสั้น ในการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่กล้วยไม้เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้อายุการบานของดอกกล้วยไม้ยาวนานขึ้น โดยเอ็นไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ก๊าซเอธิลีน เปลี่ยน ACC เป็นเอธิลีน ซึ่งก๊าซเอธิลีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อฝาครอบละอองเกสรตัวผู้ถูกเปิดออก เนื่องมาจากการถ่ายละอองเรณูหรือโดยการขนส่ง (พัฒนาและคณะ, 2542; Nadeau *et al.*, 1993) ดังนั้นหากยับยั้งขั้นตอนในการสังเคราะห์เอ็นไซม์ ACC oxidase โดยการกลับทิศทางของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC oxidase แล้วส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช การแสดงออกของยีนนี้จะยับยั้งการสังเคราะห์เอธิลีนได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการส่งถ่ายยีนในกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม ซึ่งเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองออกดอกเพียงปีละครั้ง ในช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายน และมีอายุการบานของดอกค่อนข้างสั้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมืองให้มีอายุการบานของดอกนานขึ้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และจะเป็นพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมือง ชนิดอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจ ที่มีความสำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย สามารถส่งทั้งดอกและต้นกล้วยไม้ไปจำหน่ายต่างประเทศ ทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท และประเทศไทยยังได้รับการยกย่องให้เป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดของโลกอีกด้วย และปัญหาที่เกิดกับดอกกล้วยไม้ส่งออกของไทย ได้แก่ การเหี่ยวเฉาของดอก การร่วงของดอก และกลีบดอกในระหว่างการส่งระยะไกล และอายุการใช้ประโยชน์ได้น้อยวัน การที่กล้วยไม้หมดสภาพในการใช้งานอย่างรวดเร็วนั้น มีสาเหตุสำคัญมาจากการผลิตก๊าซเอธิลีนที่สูงขึ้นของดอกกล้วยไม้ เนื่องจากการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสม ความเสียหายจากอุปกรณ์ และเครื่องมือ การเข้าทำลายของโรคและแมลง ส่งผลให้กล้วยไม้เหี่ยวเฉา อายุการเก็บรักษาและการใช้ประโยชน์สั้น และทำให้สีกลีบดอกซีดลง ได้มีความพยายามในการหาวิธีแก้ไขปัญหาดังกล่าว เช่น การปรับปรุงการเก็บเกี่ยว การใช้น้ำยายืดอายุการใช้งาน การกำจัดก๊าซเอธิลีน แต่ก็ยังประสบปัญหานี้อยู่เสมอ ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและการลงทุนสูง เนื่องจากมีกระบวนการที่ยุ่งยากและต้องใช้ความระวังสูง ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ เพื่อมีการบานของดอกนานขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม (cefotaxime) ต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นสูงที่สุด

ของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ที่ *A. tumefaciens* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม เนื่องจากสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมเป็นสารที่ใช้กำจัด *A. tumefaciens* ภายหลังการส่งถ่ายยีนแล้ว วิธีการโดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มก./ล. และสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0 25 50 75 100 125 150 และ 175 มก./ล. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสอบการเจริญของ *Agrobacterium* โดยนำอาหารเหลว LB ดังกล่าวมาวัดค่า OD_{550} (optical density) เพื่อตรวจสอบการเจริญของ *Agrobacterium* จากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้มาเขี่ย (streak) บนอาหารแข็ง LB เพื่อสนับสนุนผลการทดลองโดยบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. บันทึกผลการเจริญของ *Agrobacterium* บนอาหารแข็ง โดยสังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นสูงที่สุดของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ที่โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามสามารถมีชีวิตรอดได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม เนื่องจากสารปฏิชีวนะซีโฟแทรกซีมเป็นสารที่ใช้ฆ่า *A. tumefaciens* ภายหลังการส่งถ่ายยีนแล้ว ความเข้มข้นสูงที่สุดของสารปฏิชีวนะสามารถฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมดแต่พืชสามารถมีชีวิตรอดได้ วิธีการทดลองโดยเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขาม ที่มีขนาดประมาณ 2-3 มม. ในอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมระดับต่างๆ กันคือ 0 100 200 300 400 และ 500 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสง 16 ชม./วัน ความเข้มแสงประมาณ 40 $\mu mol/m^2/s^1$ วางแผนการทดลองแบบ CRD เพาะเลี้ยง 5 ซ้ำๆ ละ 50 โปรโตคอร์ม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโต และนับจำนวนโปรโตคอร์ม ที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นสูงที่สุดของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม สามารถมีชีวิตรอดได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เนื่องจากสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นสารที่ใช้เพื่อคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน เนื่องจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน วิธีการทดลองโดยเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม ที่มีขนาด

ประมาณ 2-3 มม. ในอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง ที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 0 10 15 20 25 30 และ 35 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสง 16 ชม./วัน ความเข้มแสงประมาณ 40 μmol m^2/s^1 วางแผนการทดลองแบบ CRD เพาะเลี้ยง 5 ซ้ำๆ ละ 50 โปรโตคอร์ม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโต และนับจำนวนโปรโตคอร์มที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

การทดลองที่ 4 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)

เลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มก./ล. เป็นเวลา 24 ชม. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที แล้วนำมาวัด OD_{550} ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5 - 1.8 เติม acetosyringone 200 μM ก่อนทำการบ่มร่วม (co-cultivation) เป็นเวลา 3 ชม. นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้มาทำให้เกิดบาดแผล โดยใช้ปลายมีดผ่าตัดจิ้มเนื้อเยื่อกล้วยไม้ให้มีจำนวน 3 แผลเท่ากันทุกโปรโตคอร์ม ก่อนนำไปบ่มร่วมกับ *Agrobacterium* หลังจากนั้นบ่มโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามในอาหารแขวนลอย *Agrobacterium* ที่เลี้ยงไว้โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 20 30 40 50 และ 60 นาที ในการบ่มโปรโตคอร์มวางแผนการทดลองแบบ CRD บ่ม 5 ซ้ำๆ ละ 50 โปรโตคอร์ม จากนั้นนำโปรโตคอร์มมาซับเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกินด้วยกระดาษซับปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง ที่เติม acetocyringone 200 μM เพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ. ให้แสง 16 ชม./วัน ความเข้มแสงประมาณ 40 μmol/m^2/s^1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยการล้างโปรโตคอร์มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซีโฟแทกซีม 500 มก./ล. ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนสู่โปรโตคอร์มโดยวิธี Gus assay โดยนำโปรโตคอร์มมาแช่ในสารละลาย X-gluc บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 คืน ตรวจดูจำนวนโปรโตคอร์มที่มีสีฟ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)

อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1 ที่มียีน antisense ACC oxidase) ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24 ชม. พบว่าในอาหารเหลว LB ที่ไม่เติมซีโฟแทกซีม เชื้อ *Agrobacterium* สามารถเจริญได้ปกติโดยวัดค่า OD_{550} เท่ากับ 1.47 แต่เมื่อเติมซีโฟแทกซีมลงในอาหาร พบว่าสามารถกำจัด *Agrobacterium* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาหารเหลวที่เติมซีโฟแทกซีม 25 มก./ล. มี

ค่า OD_{550} เท่ากับ 0.034 อาหารมีลักษณะค่อนข้างใส และในอาหารเหลว LB ที่เติมซีโฟแทกซีม 50 75 100 125 150 และ 175 มก./ล. มีค่า OD_{550} 0.028 0.026 0.023 0.018 0.017 และ 0.016 ตามลำดับ (Figure 1) และเมื่อนำเชื้อ *Agrobacterium* มาตรวจสอบการเจริญโดยการเขี่ยบนอาหารแข็ง LB พบว่ามีการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีโฟแทกซีมและที่มีซีโฟแทกซีม 25 มก./ล. เท่านั้น ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ ไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเลย แสดงว่าซีโฟทกซีมความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของประวีณา (2544) ที่พบว่าสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pBI 121) และสอดคล้องกับงานทดลองของของมณฑิณี (2545) ที่รายงานว่าซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 25 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pBI121) ได้สมบูรณ์ และงานทดลองของวริศา (2548) พบว่าเมื่อทำการทดสอบความไวของสารปฏิชีวนะต่อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ด้วยวิธี Disc Plate Technique พบว่าสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 200 มก./ล. มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* ได้ดีที่สุด ซึ่งการที่สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Agrobacterium* ได้เนื่องจากซีโฟแทกซีมเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟาโลสปอรินซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปบทิโดไกลแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียตายเนื่องจากผนังเซลล์สลายตัว (Nauerby *et al.*, 1997) ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียไม่ให้มีปริมาณมากเกินไปได้ คือจำนวนเชื้อคงที่เพราะไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะเป็นสารฆ่าแบคทีเรีย (Yu *et al.*, 2001)

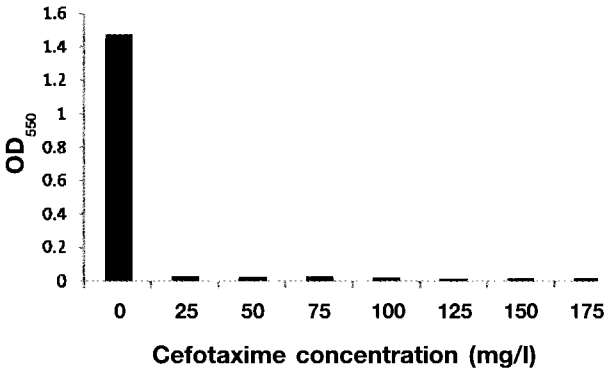


Figure 1. Growth of *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) in LB medium supplement with various cefotaxime concentrations

อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม

การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้นระดับต่างๆ กันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามสามารถเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์ ที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 100

200 300 400 และ 500 มก./ล. โดยจำนวนต้นที่รอดชีวิตไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ทุกระดับความเข้มข้นของซีโฟแทกซีมที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งจำนวนต้นที่รอดชีวิต 99.6 98.4 98 97.2 และ 97.6% ตามลำดับ (Figure 2) ลักษณะของโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม มีสีซีดลงแตกต่างจากโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมเล็กน้อย (Figure 3) ซึ่งการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ที่มีต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์นั้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารปฏิชีวนะสามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้บ่มโปรโตคอร์มได้หมด และไม่ทำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ชะงักการเจริญเติบโต เมื่อย้ายโปรโตคอร์มไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ โปรโตคอร์มยังสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ในการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของโปรโทอร์มของกล้วยไม้นั้น มีความจำเป็นเนื่องจากภายหลังการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยอาศัย *A. tumefaciens* หลังจากการบ่มชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย ต้องกำจัดแบคทีเรียหลังการบ่ม (co-cultivation) เพื่อไม่ให้ *A. tumefaciens* ก่อโรคต่อพืชจนเนื้อเยื่อที่ผ่านการส่งถ่ายยีนตายในที่สุด ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* มีการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น timentin, cefotaxime และ carbenicillin (สุมนทิพย์และเนริสา 2540) โดยในพืชต่างชนิดกันย่อมใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของพืช ที่สามารถทนทานต่อปริมาณของสารปฏิชีวนะนั้นๆ (Choi *et al.*, 1994 อ้างถึงในสุมนทิพย์. 2540) มีรายงานการใช้สารปฏิชีวนะหลายชนิดในการกำจัด *A. tumefaciens* ภายหลังการส่งถ่ายยีน เช่น มีการใช้ carbenicillin ความเข้มข้น 50 มก./ล. (Yu *et al.*, 2001) timentin ความเข้มข้น 200 มก./ล. (Liau *et al.*, 2003) meroperam ความเข้มข้น 5 มก./ล. (Mishiba *et al.*, 2005) และมีการใช้ซีโฟแทกซีมในการกำจัด *A. tumefaciens* อย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด โดยใช้ในปริมาณ 200-500 มก./ล. (Jeknic *et al.*, 1999; Belarmino and Mii, 2000; Men *et al.*, 2003; Pipatpanakul *et al.*, 2004) มีการใช้ซีโฟแทกซีมปกติในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังการส่งถ่ายยีนสู่พืช ซีโฟแทกซีมจะเข้าไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ mucopeptide ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยซีโฟแทกซีมไปจับกับเอนไซม์ transpeptidase ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้การเชื่อมต่อของสายเพบทิโดไกลแคนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ (Teixeira da Silva and Fukai, 2001) ดังนั้นในการเลือกใช้ซีโฟแทกซีมกำจัด *Agrobacterium* ต้องเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถกำจัด *Agrobacterium* ได้ และไม่ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ซีโฟแทกซีมที่ความเข้มข้น 500 มก./ล. ในการกำจัด *Agrobacterium* ออกจากเนื้อเยื่อพืช

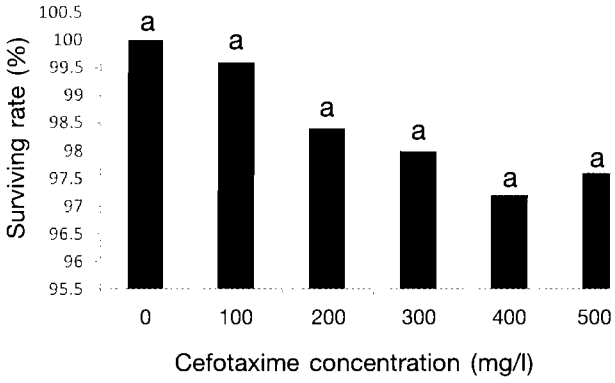
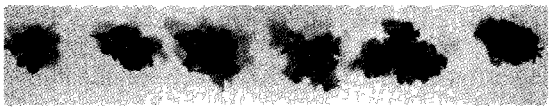


Figure 2. Surviving rate of *D. delacourii* culture on modified VW medium supplement with cefotaxime in various concentrations, bars labelled with a common letter are not significantly different at the 5% by DMRT.



0 100 200 300 400 500

Cefotaxime concentration (mg/l)

Figure 3. Plantlet of *D. delacourii* culture on modified VW medium supplement with various concentrations of cefotaxime

อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม

ในการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase เข้าสู่กล้วยไม้เอื้องดอกมะขามนั้น ได้ใช้ยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (htpII) เป็นยีนเครื่องหมายจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของโปรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามในอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินในความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขาม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ในทุกระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ จากโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน โดยโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมไฮโกรมัยซิน โปรโตคอร์มของสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยมีอัตราการรอดชีวิต 100 % ขณะที่โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 10 15 20 25 และ 30 มก./ล. โปรโตคอร์มไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (อัตราการอดชีวิต 0 %) (Figure 4) โปรโตคอร์มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซีดจากนั้นกลายเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด (Figure 5) ซึ่งความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน 10- 30 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขาม ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Belarmino และ Mii (2000) พบว่าไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่สามารถแยกกลุ่มเซลล์ของกล้วยไม้สกุล *Phaleanopsis* ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจาก กลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนได้ บุษกร (2548) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของไฮโกรมัยซินที่ยับยั้งการเจริญของโปรโตคอร์มของเอื้องเงินและมิสสิงคโปร์คือ 40 และ 30 มก./ล. Men และคณะ (2003) ใช้ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น

30 มก./ล. ในการคัดเลือกกล้วยไม้ *Phalaenopsis* และ *D. nobile* และ Mishiba และคณะ (2005) ที่ใช้ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 20 มก./ล. ในการคัดเลือกกล้วยไม้ *Phalaenopsis* แสดงว่ากล้วยไม้แต่ละสกุลหรือชนิดมีความสามารถในการต้านทานต่อไฮโกรมัยซินได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนสาเหตุที่โปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้ ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีสีเหลืองซีดและกลายเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด เนื่องจากไฮโกรมัยซินมีผลในการยับยั้ง peptide chain elongation ในการสังเคราะห์โปรตีน (สุมนทิพย์ 2540; Lin *et al.*, 1996) จึงทำให้พืชที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน

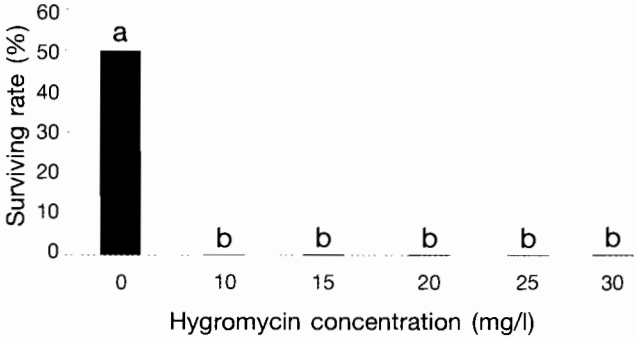


Figure 4. Surviving rate of *D. delacourii* culture on modified VW medium supplement with hygromycin various concentrations, bars labelled with a common letter are not significantly different at the 5% by DMRT.

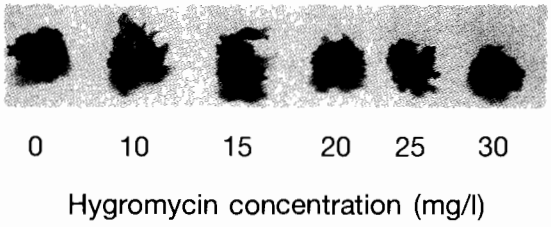


Figure 5. Plantlet of *D. delacourii* culture modified VW medium supplement with hygromycin various concentrations

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)

การบ่มโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 20 30 40 50 และ 60 นาที แล้วกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* โดยการล้างโปรโตคอร์มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซีโฟแทกซีม 500 มก./ล. ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนสู่โปรโตคอร์มโดยวิธี Gus assay โดยนำโปรโตคอร์มมาแช่ในสารละลาย X-gluc บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 1 คืน ตรวจดูจำนวนโปรโตคอร์มที่มีสีฟ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการตรวจสอบดังกล่าวเป็นการเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโปรโทคอร์มร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการส่งถ่ายยีนในโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามในโอกาสต่อไป เนื้อเยื่อที่ผ่านการตรวจสอบแล้วได้รับความเสียหายไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปได้ และจากการตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนพบว่าการแสดงออกของยีน Gus ที่ทุกระยะเวลาในการบ่มโปรโตคอร์มกับเชื้อ *Agrobacterium* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม โปรโทคอร์มเอื้อง กับเชื้อ *Agrobacterium* คือ 20 นาที เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่น้อยที่สุด

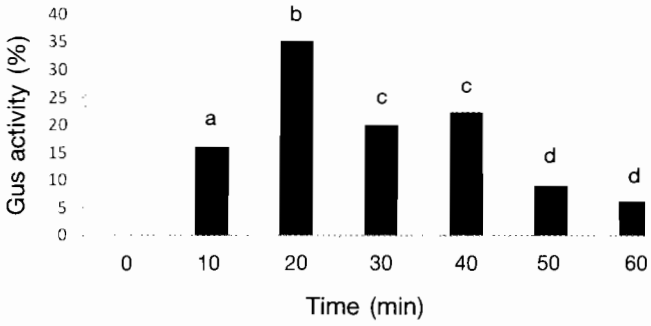


Figure 6. Effect of cocultivation in *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) on transient Gus assay of protocorms; bars labelled with a common letter are not significantly different at the 5% by DMRT.

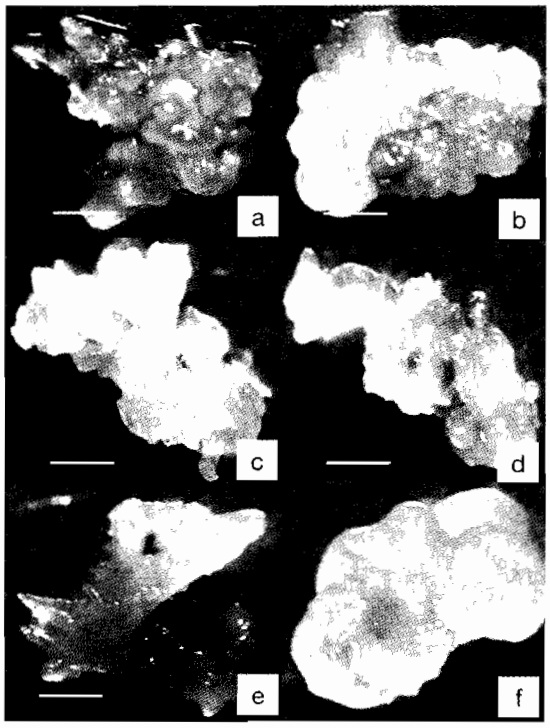


Figure 7. Visual detection of histochemical staining for Gus activity in the transgenic protocorms and plantlets of *D. delacourii* by using *Agrobacterium* - mediated transformation (a-f) incubation in *Agrobacterium* suspension for 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min respectively. (—— = 0.2 mm)

ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน Gus มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน Gus มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน Gus เท่ากับ 35.29 % (Figure 6) เมื่อระยะเวลาในการบ่มโปรโตคอร์มกับเชื้อ *Agrobacterium* เป็นเวลานานขึ้นพบว่าการแสดงออกของยีน Gus ลดลง เนื่องจากการบุกรุกทำลายของเชื้อทำให้ชิ้นส่วนของพืชตาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yu และคณะ (2001) และ Belarmino และ Mii (2000) พบว่าในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้สกุล *Phaleanopsis* นั้นระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ที่เพิ่มขึ้นไม่ช่วยเพิ่มการแสดงออกของ Gus แต่จะทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิด necrosis และตายในที่สุด ซึ่งแสดงว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ในระยะเวลาที่นานเกินไปทำให้ประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนลดลง (Men *et al.*, 2003)

โปรโตคอร์มที่มีการแสดงออกของยีน Gus เนื้อเยื่อของโปรโตคอร์มจะมีการแสดงออกเป็นสีฟ้า เมื่อบ่มในสารละลาย X-gluc บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 1 คืน (Figure 7) ซึ่งก่อนที่จะทำการบ่มโปรโตคอร์มเอื้องดอกมะขามร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* นั้นจำเป็นต้องทำให้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้เกิดบาดแผลก่อน เพื่อทำให้มีอัตราการแสดงออกของยีน Gus ได้สูงที่สุด ซึ่งจากงานทดลองของวริศา (2548) ได้รายงานว่าการทำให้โปรโตคอร์มเกิดแผลก่อนนำไปบ่มร่วมกับ *Agrobacterium* สามารถลดระยะเวลาในการบ่มร่วมกับ *Agrobacterium*

ลงได้ ดังนั้นเมื่อทำให้โปรโตคอร์มเกิดบาดแผล coniferyl alcohol ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิคก็ถูกปลดปล่อยออกมาจากโปรโตคอร์มไปกระตุ้น ให้ *Agrobacterium* เคลื่อนที่เข้ามาบุกรุกเนื้อเยื่อพืช และเกิดกระบวนการส่งถ่ายยีนสู่เซลล์พืชได้

สรุปผลการทดลอง

การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่เอื้องดอกมะขาม โดยใช้ *A. tumefaciens* สามารถส่งถ่ายยีนสู่เอื้องดอกมะขามได้ และมีการแสดงออกของยีน Gus และมีการสอดแทรกของยีนเข้าสู่ในโครโมโซมของกล้วยไม้ และสามารถต้านทานต่อไฮโกรมัยซินในระดับที่กล้วยไม้ปกติไม่สามารถเจริญได้ นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้ว ยังสามารถใช้เครื่องยิงอนุภาคในการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase ได้ แต่จะให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนค่อนข้างต่ำ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการยิงแต่ละครั้งราคาค่อนข้างแพง และขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างค่อนข้างยุ่งยาก ดังนั้นวิธีการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นตัวกลางเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สูงกว่าและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย นอกจากนี้การศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่เอื้องดอกมะขาม สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการส่งถ่ายยีนเพื่อสร้างกล้วยไม้แปลงพันธุ์ และประยุกต์ใช้ในไม้ดอกอื่นๆ ให้มีอายุการบานของดอกยาวนานขึ้นได้

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร. อนวัช สุวรรณกุล สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *A. tumefaciens* พลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสถานที่ทำงานวิจัย และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ปี พ.ศ. 2551

เอกสารอ้างอิง

บุษกร หอมกระแจะ. 2548. *การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่กล้วยไม้เอื้องเงินและมิสสิงคโปร์.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 122 หน้า.

ประวีณา คงโนนกอก. 2544. *การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้พื้นเมืองบางชนิด โดย Agrobacterium tumefaciens.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 110 หน้า.

พัฒนา ศรีฟ้า สุวิทย์ ล้อประเสริฐ และมณทินี ธีรารักษ์. 2542. การแยกยีน ACC oxidase และ ACC synthase ที่ควบคุมการสร้างเอทิลีนในกล้วยไม้. หน้า 115-118.

ใน: รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 ปี 2542 พันธุศาสตร์ช่วยชาติแก้วิกฤต. ไพศาล เหล่าสุวรรณ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์ (บรรณาธิการ) ธนาเพรส แอนด์ กราฟฟิค กรุงเทพฯ.

มณฑิณี กมลธรรม. 2545. *การชักนำให้เกิดต้นใหม่และการส่งถ่ายยีนสู่ทุเรียนพันธุ์หมอนทองและพันธุ์ชะนี.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 134 หน้า.

วริศา พิลาโฮม. 2548. *การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่เข็มขาวและเอื้องคำ.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 98 หน้า.

สลิล สิทธิสัจจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี. 2545. *คู่มือกล้วยไม้.* สำนักพิมพ์สารคดี กรุงเทพฯ. 248 หน้า.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2540. *เอกสารคำสอนวิชา 311 725 เทคโนโลยีการส่งถ่ายยีนสู่พืชชั้นสูง.* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 90 หน้า.

สุมนทิพย์ บุนนาค และเนริสา คุณประทุม. 2540. อิทธิพลของ timentin, cefotaxime และ carbenicillin ต่ออัตราการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม และความสามารถในการกำจัด *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. *ว.วิทยาศาสตร์ มข.* 25(3): 201-7.

Belarmino, M.M. and M. Mii, 2000. *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Reports* 19: 435 - 442.

Jeknic, Z, S.P. Lee, J. Davis, R.C. Ernst, and T.H.H. Chen. 1999. Genetic transformation of Iris germanica mediated by *Agrobacterium tumefaciens J. of Am. Soc.Hor. Sci.* 124(6): 575–580.

Lin, J.J.,j., Ma, N.Garcia-Assad, and J.Kuo, 1996. Hygromycin as an efficient antibiotic for the selection of transgenic plants. *Focus* 18(2): 47-79.

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

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

Mishiba, K., D.P. Chin, M. Mii, 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorm at an early stage after

germination. *Plant Cell Reports* 24: 297-303.

Nadeau, A.J., S.X., Zhang,H Nair. and D.S.O'Neill, 1993. Temporal and spatial regulation of 1-aminocyclopropane -1-carboxylate oxidase in the pollination –induced senesence of orchid flowers. *Plant Physiology* 103: 31-39.

Nauerby, B., K. Billing, and R.Wyndaele, 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbencillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 123: 169-177.

Pipatpanukul, T.,S., Bunnag, T.Theerakulpisut, and M. Kosittrakul, 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songklanakarin J. of Sci. and Tech.* 26(1): 1-13.

Teixeira da Dilva, J.K. and S. Fukai, 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *J. of Applied Hort.* 3(1): 3-12.

Yu. H., Yang, S.H., and C.J. Goh, 2001. *Agrobacterium* - mediated transformation of *Dendrobium* orchid with the 1 knox gene DOH1. *Plant Cell Reports* 20: 301-305.