Agricultural Sci. J. 43 : 3 (Suppl.) : 498-501 (2012) ว. วิทย. กษ. 43 : 3 (พิเศษ) : 498-501 (2555)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการส่งถ่ายยีน antisense PPO เพื่อแก้ปัญหาอาการไส้สีน้ำตาลในผลสับปะรด

Tissue Culture and Transformation of Antisense PPO to Reducing Blackheart Symptom in Pineapple

มนฑิณี กมลธรรม[1] สุภาวดี ชนะพาล[1] อนวัช สุวรรณกุล[1] และ บวร ตันติวรชัย[1]
Montinee Kamoltham[1], Supavadee Chanapan[1], Anawat Suwanagul[1] and Borworn Tontiworachai[1]

Abstract

Internal browning is an important limitation for export of fresh pineapple. It is a physiological disorder caused by low temperature storage of pineapple. The symptom is commonly related to polyphenol oxidase (PPO) activity. In this study, antisense RNA technology was applied to suppress PPO expression. Tissue culture on pineapple cv. Trad seethong (Queen) and Smooth cayenne were initially developed. Our results showed that pineapple crown could be sterilized by bleaching with 15% clorox followed by 5% clorox for 15 minutes in each concentration. Lateral bud of pineapple crown was successfully regenerated on MS medium. Percentage of callus induction from plantlet was 92.885% and callus size was 1-3 cm on MS medium supplemented with 0.4 mg/L 2,4-D and 0.8 mg/L TDZ. The best medium for plant regeneration from callus was MS medium supplemented with 0.4 mg/L 2,4-D. A study of antibiotic effect on callus proliferation revealed that 30 mg/L hygromycin inhibited callus growth and caused callus death at 80%, while 100-400 mg/L cefotaxime had no effect on callus growth. After gene transfer, GUS activities were detected and 8-10% of calli were able to tolerate hygromycin. Gene transfer was confirmed by PCR amplifications of 35S and NOS regions.

Keywords: pineapple, tissue culture, transformation, polyphenol oxidase

บทคัดย่อ

การส่งออกสับปะรดสดมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ อาการไส้สีน้ำตาลที่เกิดจากการเก็บรักษาสับปะรดที่อุณหภูมิต่ำระหว่างการขนส่ง ซึ่งเกิดจากกระบวนการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) การวิจัยนี้ได้นำเทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการแก้ปัญหาดังกล่าว โดยใช้เทคโนโลยี antisense RNA เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO เริ่มจากการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและปัตตาเวีย พบว่าสามารถฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวจุกสับปะรดโดยใช้คลอร็อกซ์ 15% ตามด้วย 5% เป็นเวลาความเข้มข้นละ 15 นาที ตาข้างจากจุกสามารถเจริญเป็นต้นได้ในอาหารสูตร MS และชักนำให้ต้นอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.8 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 92.85% และแคลลัสมีขนาดประมาณ 1-3 ซม. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสเกิดต้นคืออาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มก./ล.จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพบว่า hygromycin ความเข้มข้น 30 มก./ล. มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสและทำให้แคลลัสตายถึง 80% แต่ cefotaxime ความเข้มข้น 100-400 มก./ล.ไม่มีผลต่อการเจริญของแคลลัส จากการส่งถ่ายยีน antisense PPO สู่แคลลัสสับปะรดโดยใช้ *Agrobacterium* พบว่า แคลลัสสามารถต้านทานต่อ hygromycin ได้ 8-10% และพบการแสดงออกของ GUS gene จากการตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR บริเวณ 35S และ NOS พบการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายในดีเอ็นเอของพืช

คำสำคัญ: สับปะรด เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การส่งถ่ายยีน polyphenol oxidase

คำนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* Merr.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของไทย โดยมีเนื้อที่เพาะปลูกรวมทั้งประเทศประมาณ 601,000 ไร่ ปีหนึ่งๆ สามารถผลิตสับปะรดได้ประมาณ 1.9 ล้านตัน มีมูลค่าการส่งออกทั้งในรูปผลสดและแปรรูปปีละกว่า 20,000 ล้านบาท เนื่องจากสับปะรดเป็นสินค้าที่เน่าเสียง่าย เพื่อให้ผลสับปะรดสดคงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวไว้ให้นานขึ้นจึงมีการเก็บรักษาสับปะรดที่อุณหภูมิต่ำ แต่เนื่องจากสับปะรดเป็นไม้ผลเขตร้อน ปัญหาที่พบคือการเกิด

[1] ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
[1] Agricultural Technology Department, Thailand Institute of Science and Technology Research.

อาการสะท้านหนาวหรือไส้สีน้ำตาล (black heart)เกิดกับสับปะรด ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำมากกว่า 1 สัปดาห์ แล้วนำมาเก็บที่างจำหน่าย เอนอุณหภูมิห้องระหว่างการวไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดอาการดังกล่าวคือ Polyphenol oxidase (PPO) อาการไส้สีน้ำตาลเกิดจาก PPO กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ phenols เป็น 0-quinones แล้วเกิด polymerization เป็นเม็ดสีทำให้เกิดสีน้ำตาล (Nicolas *et al*., 1994) วัตถุประสงค์ของการทำงานวิจัยครั้งนี้คือวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในการแก้ไขปัญหาอาการไส้สีน้ำตาลในผลสับปะรดสดภายหลังการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ โดยการส่งถ่ายยีน antisense PPO เข้าสู่สับปะรด และเพื่อให้ได้เทคโนโลยีใหม่ๆ ในการแก้ปัญหาอาการไส้สีน้ำตาลในผลสับปะรดสดเพื่อการส่งออกในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด

นำส่วนจุกของสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและปัตตาเวียมาฟอกฆ่าเชื้อในคลอร็อกซ์ 15% และ 5% ความเข้มข้นละเวลา 15 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดส่วนตาข้างไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้น จากนั้นนำต้นอ่อนของสับปะรดมาตัดใบออกให้หมด ตัดส่วนลำต้นให้มีความยาวประมาณ 0.5 ซม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ความเข้มข้น 0, 0.4, และ 0.8 มก./ล. ร่วมกับ TDZ (thidiazural) ความเข้มข้น 0, 0.4 และ 0.8 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน สังเกตการเกิดแคลลัส จากนั้นทดลองการชักนำให้แคลลัสเกิดต้นโดยนำแคลลัสสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 1 ซม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน์ และอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน์ 2,4-D ความเข้มข้น 0.4, และ 0.8 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25$\pm$2°C ให้แสง 8 ชม./วัน เป็นเวลา 30 วัน

2. ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัสสับปะรด

ศึกษาอิทธิพลของ hygromycin ต่อการเจริญของแคลลัสสับปะรดโดยนำแคลลัสสับปะรดขนาดประมาณ 1 ซ.ม.มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.8 มก./ล. และเติม hygromycin ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ดูการเจริญเติบโตของแคลลัสและอัตราการรอดชีวิต

ศึกษาอิทธิพลของ cefotaxime ต่อการเจริญของแคลลัสสับปะรดโดยนำแคลลัสสับปะรดขนาดประมาณ 1 ซ.ม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.8 มก./ล. และเติม cefotaxime ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ดูการเจริญเติบโตของแคลลัสและอัตราการอดชีวิต

3. การส่งถ่ายยีน antisense PPO สู่สับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและปัตตาเวีย

นำเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ที่มียีน antisense PPO มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ให้มีค่า OD_{600} = 0.5-0.8 จากนั้นนำแคลลัสจากสับปะรดทั้ง 2 พันธุ์มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 0.2 มม. นำมาบ่มร่วมกับสารละลาย *Agrobacterium* ที่เตรียมไว้ โดยเขย่าเป็นระยะที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำแคลลัสมาซับเชื้อออกโดยใช้ทิชชูปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำแคลลัสมากำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ออกโดยล้างแคลลัสใน cefotaxime 200 มก./ล. เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.8 มก./ล. และเติม hygromycin 30 มก./ล. และ cefotaxime 200 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายยีนแล้ว จากนั้นตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay ถ้าเนื้อเยื่อปรากฏสีฟ้าแสดงว่าได้รับยีน และการตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค PCR

ผล

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด

จากการเพาะเลี้ยงลำต้นสับปะรดในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีมาก โดยสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ MS ที่เติม 2,4-D 0.4 มก/.ล. ร่วมกับ TDZ 0.8 มก./ล. โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 92.85 % และแคลลัสมีขนาดใหญ่ประมาณ 1 ถึง 3 ซม. (Figure 1a, b) และจากการชักนำให้แคลลัสเกิดต้นใหม่พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 0.4 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน. (Figure 1c, d)

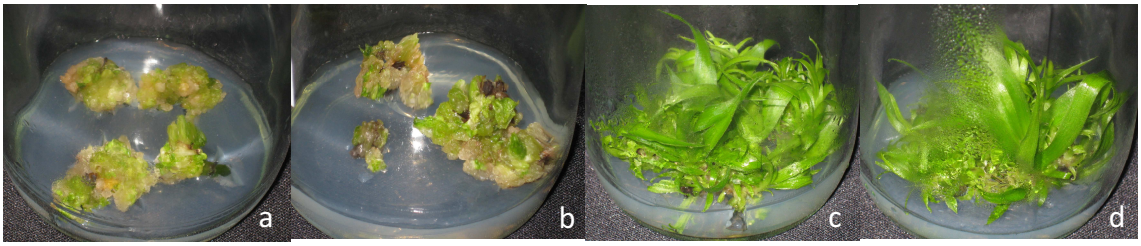

Figure 1 Callus formation from pineapple plantlets cv. Trad seethong on MS medium supplemented with 0.4 mg/l 2,4-D and 0.8 mg/l TDZ (a,b) and shoots regenerated from calli on MS medium supplemented with 0.4 mg/l TDZ. (c,d)

2. ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัสสับปะรด

จากการศึกษาอิทธิพลของ hygromycin ต่อการเจริญของแคลลัสพบว่าที่ความเข้มข้น 30 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัส และแคลลัสตายลงถึง 80% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (Figure 2a) และจากการศึกษาอิทธิพลของ cefotaxime ต่อการเจริญของแคลลัส พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ถึง 300 มก./ล. แคลลัสสามารถเจริญได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม แต่ที่ความเข้มข้น 400-500 มก./ล. แคลลัสเจริญได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย (Figure 2b)

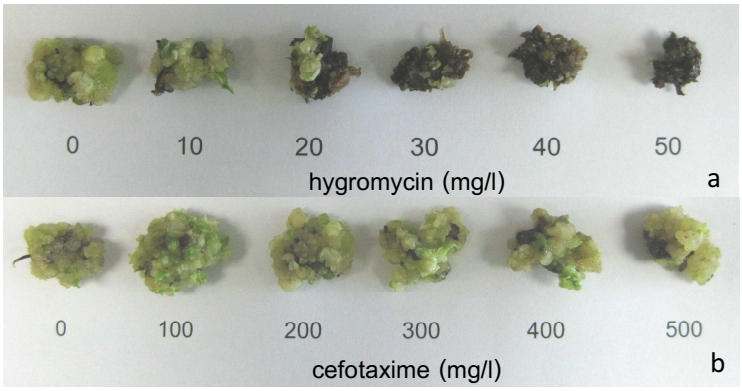

Figure 2 Effect of vary concentration of hygromycin (a) and cefotaxime (b) on pineapple calli cv. Trad seethong cultured for 30 days.

3. การส่งถ่ายยีน antisense PPO สู่สับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและปัตตาเวีย

จากการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสสับปะรดโดยใช้ *Agrobacterium* ที่มียีน antisense PPO และคัดเลือกเนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายยีนในอาหารที่เติม hygromycin เป็นเวลา 30 วัน พบว่ามีแคลลัสรอดชีวิต 8-10% และเมื่อนำเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตไปตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay พบว่าเนื้อเยื่อมีสีฟ้าแสดงว่าได้รับยีน antisense PPO (Figure 3) และเมื่อตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR ใช้ดีเอ็นเอของแคลลัสสับปะรดที่ผ่านการส่งถ่ายยีนเป็นต้นแบบ เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.1+35S ที่มีชิ้นยีนสำหรับ antisense เป็นต้นแบบ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 195 และ 180 จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 35S และ NOS แถบดีเอ็นเอที่พบในดีเอ็นเอจากแคลลสสับปะรดมีขนาดเท่ากับกับที่พบในพลาสมิด pCAMBIA 1305.1+35S ที่มีชิ้นยีนสำหรับ antisense (Figure 4) แสดงว่าพืชได้รับการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium*

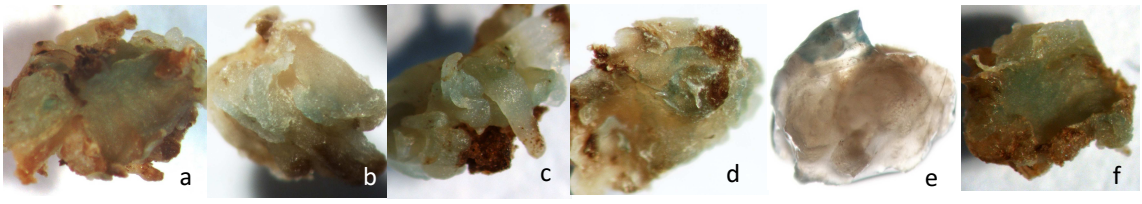

Figure 3 GUS activity in pineapple calli cv. Trad seethong (a,b,c) and cv. Smooth cayenne (d,e,f)

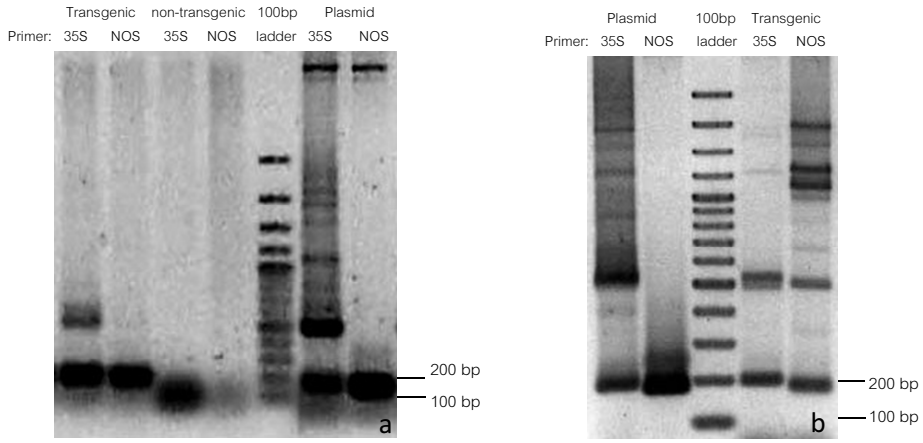

Figure 4 PCR analysis of transsgenic and non-transgenic pineapple calli using 35s and NOS primer (a) cv. Trad seethong (b) cv. Smooth cayenne

วิจารณ์ผล

จากการทดลองการส่งถ่ายยีน antisense PPO สู่แคลลัสสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและพันธุ์ปัตตาเวียโดยใช้ *Agrobacterium* พบว่าสามารถส่งถ่ายยีนได้สำเร็จโดยพบการแสดงออกของยีน GUS และพบการสอดแทรกของดีเอ็นเอที่ส่งถ่ายในแคลลัส และสามารถชักนำให้แคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายยีนเจริญเป็นต้นใหม่ได้ สอดคล้องกับในงานวิจัยของ Ko *et al*. (2005) ได้ทำการทดลองการส่งถ่ายยีน antisense PPO สู่สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียโดยใช้ *Agrobacterium* พบว่ามีเปอร์เซนต์การส่งถ่ายยีน 1.5% ซึ่งสูงกว่าการส่งถ่ายยีนโดยใช้ gene gun ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีนเท่ากับ 1.0% และสามารถชักนำให้แคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายยีนสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้

สรุป

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดพบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้ต้นอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.8 มก./ล. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสเกิดต้นคือ MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มก./ล. จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัสพบว่าความเข้มข้นของ hygromycin ที่เหมาะสมในการใช้คัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายยีนคือ 30 มก./ล. และใช้ cefotaxime 200 มก./ล.ในการฆ่าเชื้อ *Agrobacterium* หลังจากการส่งถ่ายยีนแล้วเนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อได้ดีและไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ จากการส่งถ่ายยีน antisense PPO สู่แคลลัสสับปะรดโดยใช้ *Agrobacterium* พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อร่วมกับแคลลัสคือ 15 นาที และเลี้ยงร่วมกันในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน จึงกำจัด *Agrobacterium* ออก เมื่อตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน พบการแสดงออกของ GUS gene ในแคลลัส และจากการตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR บริเวณ 35S และ NOS พบการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายในดีเอ็นเอของพืช

เอกสารอ้างอิง

Firoozabady, E., M. Heckert and N. Gutterson. 2006. Transformation and regeneration of pineapple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84: 1-16.

Ko, L., V. Hardy, M. Jobin-Décor, P. Campbell, K. Eccleston, M. Graham and M. Smith. 2005. The introduction of transgenes to control blackheart in pineapple : biolistic vs *Agrobacterium* transformation. Department of primary industries & fisheries, Queensland, Australia.

Nicolas J. J., F. C. Richard-Forget , P.M. Goupy, M. J. Amiot and S. Y. Aubert. 1994. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. Critical reviews in food science and nutrition 34: 109-157.

Sripaoraya, S., R. Marc, B. Power and R. M. Davey. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro* Cell Development biological Plant 39: 450-454.

Teng, L. W. 1997. An alternative propagation method of *Ananas* through odule culture. Plant Cell Report 16: 454-457.