



การศึกษาการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ปทุมมากระถางด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

วารุต อยู่คง¹, รัฐพร จันทร์เดช^{1*} และนพกาญจน์ จันทร์เดช²

A Study on *Gus* Gene Transformation into Potted Curcuma Via

Agrobacterium tumefaciens

Warut U-Kong¹, Ruttaporn Chundet^{1*} and Nopakarn Chandet²

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

* Corresponding author. E-mail address: auanmolec@gmail.com

Received: 5 September 2016; Accepted: 8 November 2016

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ปทุมมากระถางโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ในการส่งถ่ายยีน เมื่อนำยอดปทุมมากระถางมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิด retarded shoots ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของ retarded shoots โดยวาง retarded shoots บนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะซีฟทาซิมและกานามัยซินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเอโคโรแบคทีเรีย และยับยั้งการเจริญเติบโตของ retarded shoots ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนคือ 250 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการส่งถ่ายยีน โดยนำ retarded shoots ปทุมมากระถางมาเขย่าร่วมกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมีพาหะลูกผสม pStart ที่มียีน *gus* แล้วนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี GUS histochemical assay ผลการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยการเขย่า ร่วมกับแบคทีเรียเป็นเวลา 30 นาที จะมีการแสดงออกของยีนสูงสุดถึง 51.61%

คำสำคัญ: ปทุมมากระถาง ยีน *gus* retarded shoots *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

The objective of this study was to transfer *gus* gene into potted curcuma via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. The shoots of potted curcuma were cultured on MS solid medium supplemented with IAA (0.1 mg/l), TDZ (0.5 mg/l) and IMA (4.0 mg/l). A hundred percent of retarded shoots induction was observed. The retarded shoots were then cultured on the media supplemented with different concentration of antibiotics for 6 weeks. The appropriate concentration of cefotaxime and kanamycin that could inhibit the growth of *Agrobacterium* and the induction of non-transgenic shoots were 250 mg/l and 100 mg/l, respectively. The transformation was subsequently performed by shaking incubation of potted curcuma retarded shoots with *A. tumefaciens* LBA4404 carrying *gus* recombinant vector pStart. The expression of *gus* gene in transgenic shoots was investigated by GUS histochemical assay. Results revealed that the expression of *gus* gene was highest (51.61%) in transgenic shoots incubated with *Agrobacterium* for 30 min.

Keywords: potted curcuma, *gus* gene, retarded shoots, *Agrobacterium tumefaciens*

บทนำ

ปทุมมากระถางเป็นไม้ดอกที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากปทุมมาพันธุ์ตัดดอก ซึ่งปทุมมากระถางมีความสูงจากโคนต้นถึงปลายช่อดอก 15-30 เซนติเมตร ช่อดอกมีขนาดเล็ก ออกดอกครั้งละ 3-4 ดอก อายุการใช้งานของช่อดอกนานถึง 4-5 สัปดาห์ เหมาะสำหรับนำไปประดับอาคารบ้านเรือน โต๊ะทำงาน และตกแต่งสวน โดยปทุมมากระถางกำลังได้รับความนิยมในต่างประเทศ โดยเฉพาะญี่ปุ่น และเนเธอร์แลนด์ โดยมีราคากระถางละประมาณ 160-200 บาท (KP Holland, 2016) ตามขนาดของกระถาง โดยปทุมมากระถางในปัจจุบันมีสีดอกค่อนข้างน้อย สีแดง ชมพู และขาว จากความนิยมที่เพิ่มมากขึ้นทำให้มีความจำเป็นในการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมากระถางให้มีความหลากหลายของสีดอกเพิ่มมากขึ้น เพื่อเน้นการตอบสนองต่อความต้องการของตลาดให้มากขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้ระยะเวลาแรงงานสูงในการปลูก และคัดเลือก ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์กันอย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้พืชที่มีลักษณะที่ดีเพิ่มเติม 1-2 ลักษณะในเวลาอันรวดเร็ว เช่น มีความต้านทานโรค ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช การเพิ่มอายุการใช้งาน และการสร้างพืชให้มีสีส้มตามที่ต้องการ (Topponyanont, 2002) งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มอายุการใช้งานและความต้านทานโรค เช่น *Alstroemeria*, *Gladiolus*, *Hyacinth* และ *Lily* การสร้างพืชให้มีสี และรูปแบบของพืชตามต้องการในพืชมะเขือหรือการเพิ่มอายุการใช้งานของดอก *Daylily* (Derolles, Boase, Lee, & Peters, 2002) เป็นต้น แต่ในขั้นตอนของการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมากระถางยังต้องการงานพื้นฐานในการส่งถ่ายยีน เช่น ชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมากระถาง วิธีการส่งถ่ายยีนตลอดจนระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์หลังการส่งถ่ายยีน ในปัจจุบันการส่งถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ พืชมะเขือ และเบญจมาศ (Brugliera et al., 2013; Chu, Chen, Wu, Cai, & Pan, 2015) ดังนั้นงานวิจัยนี้ศึกษาการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ปทุมมากระถางโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เป็นพาหะ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

วิธีการศึกษาและวัสดุอุปกรณ์

1. การเตรียมเนื้อเยื่อ retarded shoots เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน

นำช่อดอกย่อยปทุมมากระถางมาชักนำให้เกิดยอดบนสูตรอาหารแข็ง MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม benzylaminopurine (BA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน ต่อมายกย้ายยอดให้เกิด retarded shoots โดยนำยอดมาตัดให้ได้ขนาด 0.5 เซนติเมตร วางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Imazalil (IMA) ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Topponyanont, Chongsang, Chujan, Somsueb, & Nuamjaroen, 2005) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้เนื้อเยื่อ retarded shoots เป็นตัวอย่างพืชสำหรับส่งถ่ายยีน *gus*

2. การทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินเพื่อใช้เป็นการคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

นำเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาตัดให้ได้ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร วางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำๆ ละ 3 ตัวอย่าง ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้น นำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 20

3. การทดสอบสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ retarded shoots

นำเนื้อเยื่อ retarded shoot ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาตัดให้ได้ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร วาง

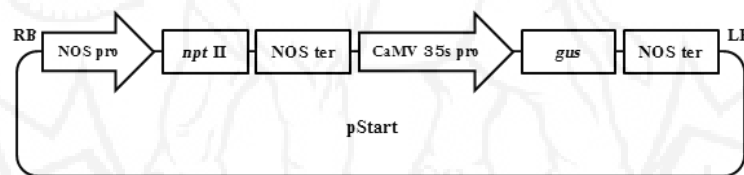


บนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซึมความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำๆ ละ 3 ตัวอย่าง ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ บันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้น นำข้อมูลไปหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 20

4. การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียเพื่อใช้สำหรับการส่งถ่ายยีน

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด binary vector pStart ซึ่งมียีน neomycin phosphotransferase (*nptII*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก และยีน β -glucuronidase (*gus*) เป็นยีนรายงานผลเพื่อใช้ตรวจสอบการแสดงออกใน

พืช โดยมีโปรโมเตอร์ CaMV35S เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน (รูปที่ 1) บนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรแฟมพิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 วัน ในที่มีด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหารแข็ง LB นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรแฟมพิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บนเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ mid-log-phase และนำเซลล์ไปวัดค่า OD₆₀₀ ให้อยู่ในช่วง 0.3-0.5 โดยใช้เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ ทำการเก็บเซลล์อะโกรแบคทีเรียโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซิโตไซริงก่อน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 1 โครงสร้างของเวกเตอร์ pStart ที่มียีน *gus* (β -glucuronidase) และยีน *npt II* (neomycin phosphotransferase gene) ซึ่งถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV 35S (35S Cauliflower mosaic virus) NOS (Nopaline synthase gene terminator) และ NOS terminator โดยตำแหน่งของยีนทั้งหมดจะอยู่ระหว่าง right border (RB) และ left border (LB) ของเวกเตอร์

5. การส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อ retarded shoots ของปทุมมากระถาง

นำ retarded shoots ที่เตรียมไว้ มาตัดให้ได้ขนาด 0.5×0.5×0.5 เซนติเมตร จำนวน 100 ตัวอย่าง มาแช่ลงในสารละลายแขวนลอยแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ทำการเขย่าร่วมกันเป็นเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นซับเชื้อส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติมอะซิโตไซริงก่อน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ในที่มีด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการล้างเนื้อเยื่อ retarded shoots

ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และล้างด้วยอาหารเหลว MS ที่เติมซีโฟแทกซึม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย แล้ววางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซึม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผล และตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน

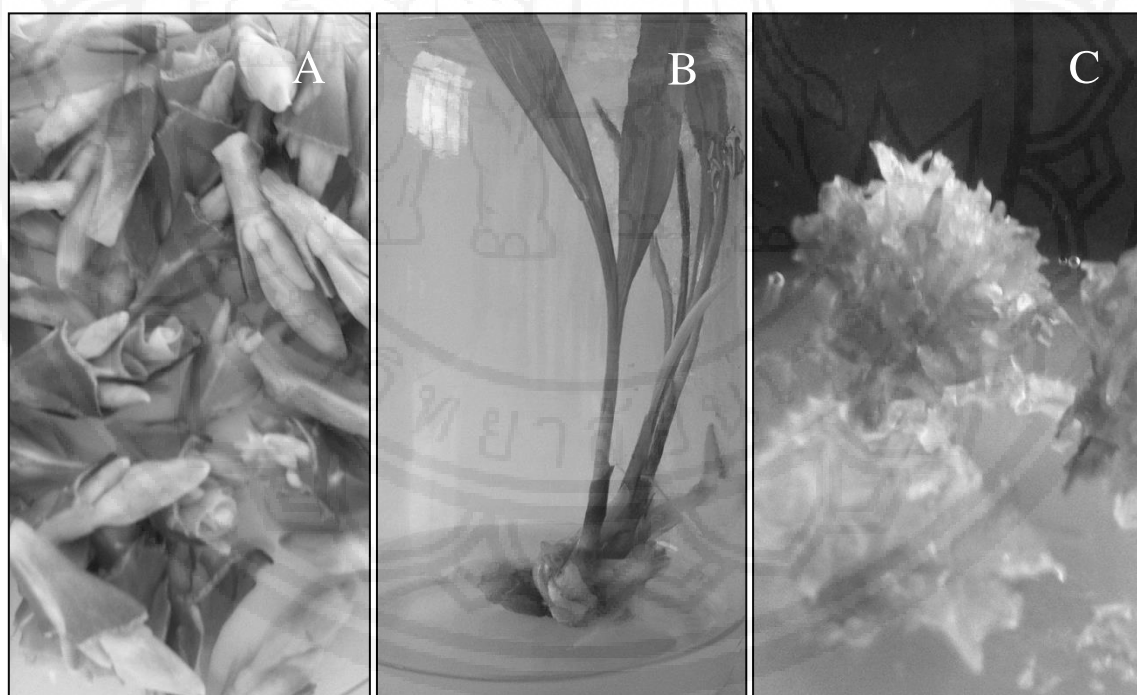
6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ภายในเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี GUS Histochemical assay โดยดูการติดสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ β -glucuronidase นำเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่ผ่านการถ่ายยีน หลัง 6 สัปดาห์แล้ว มาแช่ในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) (0.05 mM X-Gluc ใน 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 0.1% Triton X-100, 0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ และ 0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และย่ำตัวอย่างมาแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15-20 นาที จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้เห็นการติดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อ หรือจนกระทั่งเห็นว่าคลอโรฟิลล์หมด แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* จากการติดสีน้ำเงินภายในชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

ผลการศึกษา

1. การเตรียมเนื้อเยื่อ retarded shoots เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน

จากการนำช่อดอกย่อยของปทุมมากระถาง (รูปที่ 2 A) วางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดที่บริเวณฐานของช่อดอกปทุมมากระถาง จำนวน 2 ยอด ต่อชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 2 B) หลังจากนั้นนำยอดที่ได้มาตัดให้ได้ขนาด 0.5 เซนติเมตร วางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิด retarded shoots พบว่า สามารถชักนำให้เกิด retarded shoots ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีลักษณะเป็นยอดย่อยขนาดเล็กๆ จำนวน ประมาณ 30-40 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 2 C) สำหรับใช้ในการส่งถ่ายยีน



รูปที่ 2 การเตรียมเนื้อเยื่อ retarded shoots เพื่อใช้สำหรับส่งถ่ายยีน โดยภาพ A คือ ช่อดอกย่อยของปทุมมากระถาง ภาพ B คือ ยอดปทุมมากระถางที่เกิดจากช่อดอกย่อยบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภาพ C คือ เนื้อเยื่อ retarded shoots ปทุมมากระถางที่เกิดจากยอดบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



2. การทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินเพื่อใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

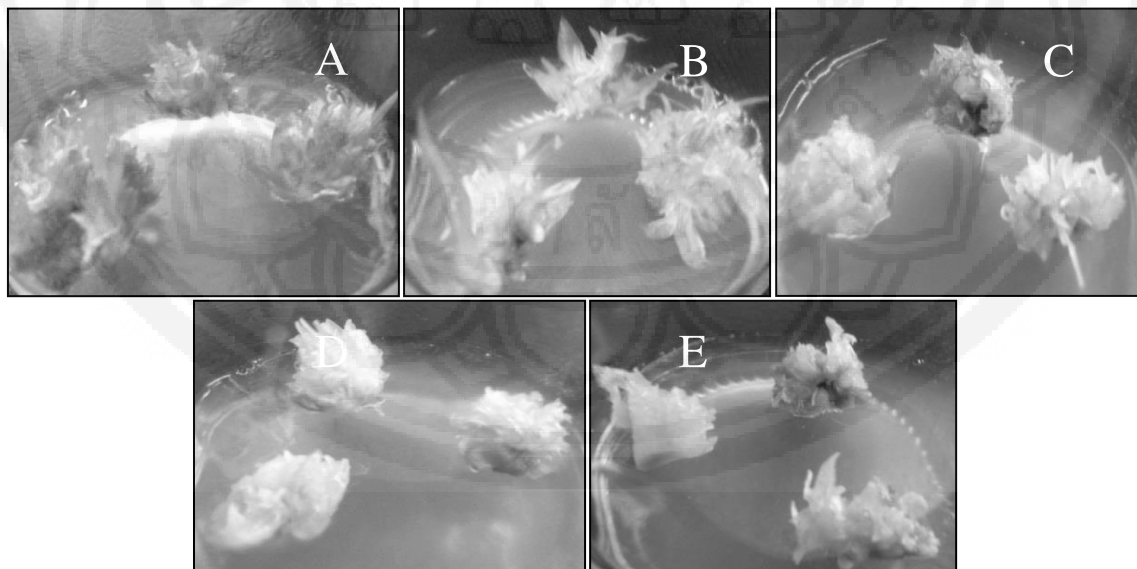
การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินเพื่อใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายยีน ที่มี *nptII* ซึ่งควบคุมลักษณะที่มีการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยทำการตัดเนื้อเยื่อ retarded shoots ให้ได้ขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารไม่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน เนื้อเยื่อ retarded shoots สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาอย่างเป็นปกติ และ

เนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 30 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 3 A, ตารางที่ 1) ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อ retarded shoots ยังคงมีการสร้างยอดใหม่เกิดขึ้น แต่มีจำนวนลดลง โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 20 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 3 B) ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อ retarded shoots ไม่สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้ เนื้อเยื่อกลายเป็นสีเหลือง และตาย (รูปที่ 3 C D E) ดังนั้นจึงเลือกใช้กานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เนื้อเยื่อ retarded shoots ไม่สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้ มาใช้ในการส่งถ่ายยีน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ retarded shoots หลังจาก 6 สัปดาห์

กานามัยซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E) ^a
0	30 $\pm$ 0.05 ^a
50	20 $\pm$ 0.07 ^b
100	00 $\pm$ 0.00 ^c
150	00 $\pm$ 0.00 ^c
200	00 $\pm$ 0.00 ^c

^a ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



รูปที่ 3 การทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินเพื่อใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยวางเนื้อเยื่อ retarded shoots บนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (A) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่วางบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50 (B), 100 (C), 150 (D) และ 200 (E) มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การทดสอบสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ retarded shoots

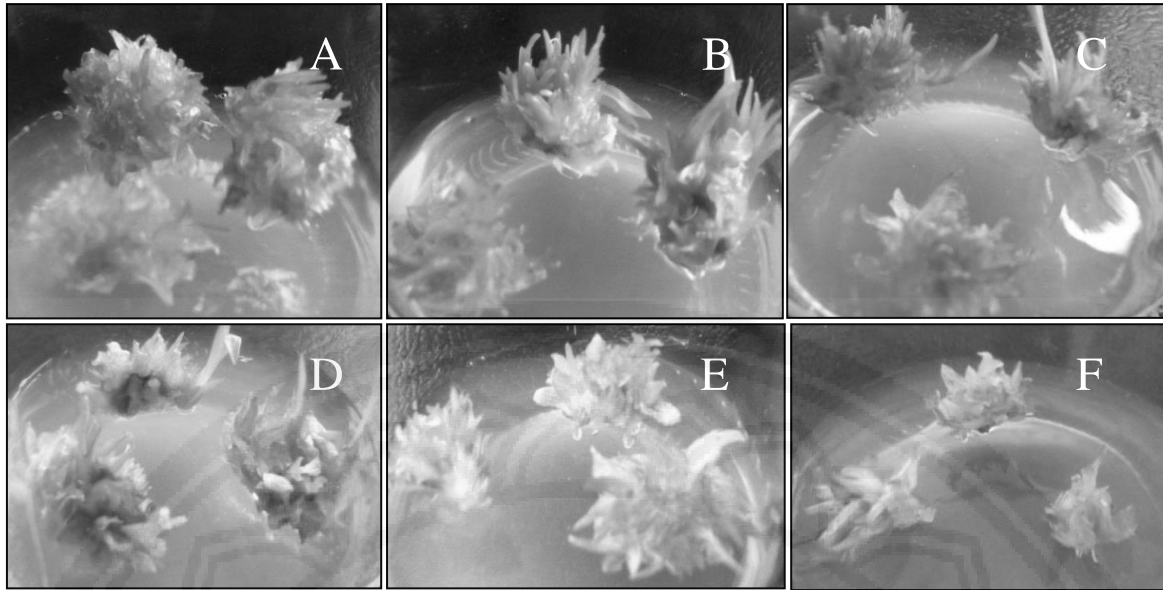
การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมเพื่อใช้เป็นสารกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยทำการตัดเนื้อเยื่อ retarded shoots ให้ได้ขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร IMA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารไม่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม เนื้อเยื่อ retarded shoots สามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาอย่างเป็นปกติ และเนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 30 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 4 A,

ตารางที่ 2) เนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อ retarded shoots ยังสามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นได้แต่มีจำนวนลดลง และเนื้อเยื่อยังคงเป็นสีเขียว โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 28, 28, 27, 27 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ (รูปที่ 4 B C D E) ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อ retarded shoots ยังสามารถสร้างยอดใหม่ขึ้นมาได้แต่มีจำนวนยอดที่ลดลงมากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 10 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 4 F) ดังนั้นจึงเลือกใช้ซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อเนื้อเยื่อน้อยที่สุด

ตารางที่ 2 ผลของซีโฟแทกซิมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างยอดของเนื้อเยื่อ retarded shoots หลัง 6 สัปดาห์

ซีโฟแทกซิม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E) ^a
0	30 $\pm$ 0.19 ^a
100	28 $\pm$ 0.21 ^a
150	28 $\pm$ 0.21 ^a
200	27 $\pm$ 0.20 ^a
250	27 $\pm$ 0.20 ^a
300	10 $\pm$ 0.12 ^b

^a ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



รูปที่ 4 การทดสอบสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ retarded shoots โดยภาพ A คือเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารไม่เติมสารปฏิชีวนะ ภาพ B คือเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ภาพ C คือเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ภาพ D คือเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ภาพ E คือเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ภาพ F คือเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่วางบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อ retarded shoots ของปทุมมากระถาง

จากการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART ที่ประกอบด้วย ยีน *npt II* และยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อ retarded shoots ของปทุมมากระถาง อาศัยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 โดยมีระยะเวลาในการแช่เนื้อเยื่อ retarded shoots ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที แล้วนำไปวางบนสูตรอาหารคัดเลือก MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนนั้นสามารถเจริญเติบโต และสร้างยอดใหม่ได้บนอาหารคัดเลือก ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก โดยเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่เขย่าวรร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 30 นาที มีจำนวนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกมากที่สุด 62 ชิ้น (ตารางที่ 3, รูปที่ 5 A) ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่เขย่าวรร่วมกับเชื้อ

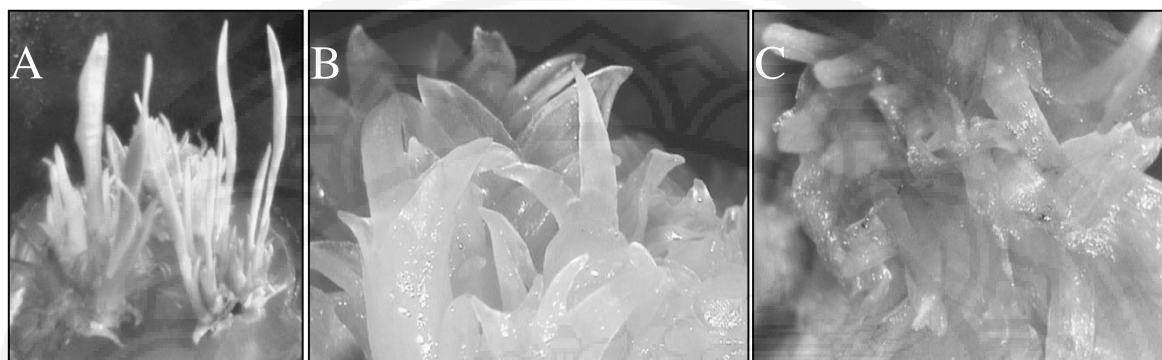
แบคทีเรียเป็นเวลา 10, 20 และ 40 นาที มีจำนวนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก 35, 58 และ 42 ชิ้น ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่เขย่าวรร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 0 นาที ไม่พบการรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay หลังจากวางเนื้อเยื่อ retarded shoots บนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่เขย่าวรร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 30 นาที มีการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด จากการติดสีน้ำเงินภายในชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ตารางที่ 3, รูปที่ 5 B) มีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน 51.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนไม่ติดสีน้ำเงินภายในชิ้นเนื้อเยื่อ(รูปที่ 5 C)

ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาในการเขย่าวรร่วมกันของเนื้อเยื่อ retarded shoots และเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ระยะเวลา (นาท)	จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมดที่ ใช้สำหรับการส่งถ่ายยีน	จำนวนเนื้อเยื่อที่การรอด ชีวิตบนอาหารคัดเลือก (n)	จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดจุด สีฟ้า (x)	ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน x/n (เปอร์เซ็นต์)
0	100	0	0	0
10	100	35	13	37.14
20	100	58	24	41.37
30	100	62	32	51.61
40	100	42	16	38.09



รูปที่ 5 ลักษณะของเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยการเขย่าวรร่วมกับแบคทีเรียเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (A) ก่อนนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งจะติดสีน้ำเงิน (B) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนซึ่งจะไม่ติดสีน้ำเงิน (C)

อภิปรายผลการศึกษา

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้สำหรับคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากพืชที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยทำการวางเนื้อเยื่อ retarded shoots บนสูตรอาหารแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร IMA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ และเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน เพื่อใช้สำหรับคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน พบว่ากานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saetiew & Arunyanart (2008) ที่ศึกษาหาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินสำหรับใช้คัดเลือกหน่อปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิกัดที่ได้รับการส่งถ่ายยีน พบว่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิกัดได้ ส่วนงานวิจัยของ Mahadtanapuk, Topoonyanont, and Handa (2006) ใช้กานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม

ต่อลิตร สำหรับการคัดเลือก retarded shoots ของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิกัด ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยกานามัยซินนั้นเป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรีย และใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยยีน *npII* แยกได้จากแบคทีเรีย Tn5 มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase II มีผลยับยั้งการทำงานของ aminoglycoside antibiotic ได้ด้วยกระบวนการเติมหมู่ ฟอสเฟต (phosphorylation) ตัวอย่างของ aminoglycoside antibiotic ได้แก่ กานามัยซิน, เจนตามัยซิน และ พารโม่ัยซิน ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อการสร้างโปรตีนโดยจะเกาะกับ 30S ribosomal subunit จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถถอดรหัส และแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนได้ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Estopà, Marfà, Melè, & Messegue, 2001)

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร กับเนื้อเยื่อ retarded shoots เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ retarded shoots ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่มี



ผลกับเนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุด และไม่มีมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdullah et al. (2005) ที่ใช้ซีโพอแทกซึม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรีย ในการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่หน่อของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิงค์ โดยใช้ซีโพอแทกซึมเป็นสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรีย นอกจากเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยใช้ซีโพอแทกซึมจะเข้าไปจับกับเอนไซม์ peptidoglycan transpeptidase ทำให้ไม่มีการเชื่อมต่อของสาย peptidoglycan จึงมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยไม่มีผลต่อเซลล์พืช (Koronfel, 1998)

ผลจากการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อ retarded shoots ของปทุมมากระถาง โดยการแช่เนื้อเยื่อ retarded shoots ร่วมกับเชื้ออะโกราแบคทีเรีย เป็นเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อ retarded shoots มาวางบนสูตรอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการแช่เนื้อเยื่อ retarded shoots ร่วมกับเชื้ออะโกราแบคทีเรีย เป็นเวลา 30 นาที สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด และมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสูงถึง 51.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่ที่ 0 นาที ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* (ตารางที่ 3) เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการแช่เนื้อเยื่อ retarded shoots ร่วมกับเชื้ออะโกราแบคทีเรียที่สั้นเกินไป มีผลทำให้เนื้อเยื่อ retarded shoots ได้รับเชื้ออะโกราแบคทีเรียน้อยไปโอกาสที่เกิดการส่งถ่ายยีนจึงน้อยลงด้วย ขณะที่พบว่าการใช้ระยะเวลาในการแช่เนื้อเยื่อ retarded shoots ร่วมกับเชื้ออะโกราแบคทีเรีย นาน 40 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมีผลทำให้เนื้อเยื่อ retarded shoots เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลอ่อน และมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งน่าจะเป็นเพราะเมื่อเนื้อเยื่อ retarded shoots สัมผัสกับเชื้ออะโกราแบคทีเรียจะผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งการบุกรุก และการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกราแบคทีเรีย (Carvalho et al., 2004) การที่เนื้อเยื่อ retarded shoots สัมผัสกับเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

ปริมาณมากจึงมีการสร้างสารทุติยภูมิมากจนเกิดผลกระทบต่อการรอดชีวิต และพัฒนาการของเนื้อเยื่อ retarded shoots เอง

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่ปทุมมากระถาง โดยสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้เป็นสารคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ส่วนสารปฏิชีวนะซีโพอแทกซึม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่ใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียภายหลังการส่งถ่ายยีน และการเขย่าร่วมกันระหว่างเนื้อเยื่อ retarded shoots กับเชื้ออะโกราแบคทีเรีย นาน 30 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน 51.61 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่ปทุมมากระถางเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ที่ตรงตามความต้องการได้

เอกสารอ้างอิง

- Abdullah, R., Zainal, A., Yew Heng, W., Chui Li, L., Chee Beng, Y., Mei Phing, L., ... Azma Jusoh, S. (2005). Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 24–34.
- Brugliera, F., Tao, G. Q., Tems, U., Kalc, G., Mouradova, E., Price, K., ... Tanaka, Y. (2013). Violet/blue chrysanthemums—metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant and Cell Physiology*, 54(10), 1696–1710.
- Carvalho, C. H. S., Zehr, U. B., Gunaratna, N., Anderson, J., Kononowicz, H. H., Hodges, T. K., & Axtell, J. D. (2004). Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 259–269.



- Chu, Y. X., Chen, H. R., Wu, A. Z., Cai, R., & Pan, J. S. (2015). Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes in *Petunia hybrida*. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 5010–5021.
- Derolles, S. C., Boase, M. R., Lee, C. E., & Peters, T. A. (2002). *Gene transfer to plants*. In A. Vainstein (Ed.). *Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Estopà, M., Marfa, V., Mele, E., & Messeguer, J. (2001). Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 65(3), 211–220.
- Koronfel, M. (1998). Effects of the antibiotics kanamycin, cefotaxime and carbenicillin on the differentiation of flax hypocotyls. *Arabian Journal of Biotechnology*, 1(1), 93–98.
- KP Holland. (2016). *Curcuma Siam*. Retrieved from [http:// www.kpholland.nl](http://www.kpholland.nl)
- Mahadtanapuk, S., Topoonyanont, N., Handa, T., Sanguansermisri, M., & Anuntalabhochai, S. (2006). Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using retarded shoots. *Plant Biotechnology*, 23(2), 233–237.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 473–497.
- Saetiew, K., & Arunyanart, S. (2008). Gene transfer to patumma (*Curcuma alismatifolia*) by *Agrobacterium* transformation. *Agricultural Sci J*, 39(3), 211–214.
- Topoonyanont, N. (2002). *Micropropagation*. Chiang Mai, Thailand: iBeam Press Studio.
- Topoonyanont, N., Chongsang, S., Chujan, S., Somsueb, S., & Nuamjaroen, P. (2005). Micropropagation scheme of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. *Acta Hort*, 673, 705–713.