ปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

Biological Factors Affecting Gene Transformation in Embryogenic Callus of Oil Palm by *Agrobacterium tumefaciens*

สุรีรัตน์ เย็นช้อน

Sureerat Yenchon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ผู้เขียน นางสาวสุรีรัตน์ เย็นช้อน

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

…….ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

…….กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

…….

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม
ผู้เขียน	นางสาวสุรีรัตน์ เย็นช้อน
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะต่ออัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันในกระบวนการส่งถ่ายยีน โดยศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือก และศึกษาปัจจัยชีวภาพที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน ได้แก่ แหล่งที่มาของชิ้นส่วน ชนิดสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิด อายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม พบว่า ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมที่เหมาะสมคือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาและสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้ สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนเทพาเหมาะสมในการใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น สายเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพสูงคือ อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนที่คัดเลือก และการใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ จุ่มแช่ในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ปรับความหนาแน่นเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 (OD_{600}=0.8) เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็งสูตร MS เติมอะซิโตไซริงกอนความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วัน ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังถ่ายยีน 2 สัปดาห์ และหลังถ่ายยีนระยะเวลา 8 สัปดาห์ ให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน 63.89 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 4 เอ็มบริโอต่อการวางเลี้ยง เมื่อยืนยันการปลูกถ่ายยีนด้วยการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส

Thesis Title	Biological Factors Affecting Gene Transformation in Embryogenic Callus of Oil Palm by *Agrobacterium tumefaciens*
Author	Miss Sureerat Yenchon
Major Program	Plant Science
Academic Year	2009

ABSTRACT

The influence of antibiotic on survival rate of embryogenic callus of oil palm was evaluated. The effects of the suitable concentration of cefotaxime to eliminate of *Agrobacterium tumefaciens* and hygromycin for selection were investigated. The biological factors including source of explant, *Agrobacterium* strains and type of plasmids, age of embryogenic callus, density of *Agrobacterium*, inoculation and co-cultivation period were studied. The results showed that concentration of cefotaxime at 200 mg/l was suitable for inhibition overgrowth of *Agrobacterium*. This concentration promoted somatic embryo production. Hygromycin at 30 mg/l was completely inhibited growth (100%) of callus, suitable for selection of transformed embryogenic callus. Thepa embryogenic callus and *Agrobacterium* strain AGL-1 containing plasmid pCAMBIA1304 which carrying the gene *gus* and *hpt* used as screenable and selectable marker genes, respectively, gave the best transformation efficiency. The embryogenic callus at 4 weeks after culture inoculated in *Agrobacterium* solution at density of 0.8 (O.D. at 600 nm) for 6 hours and co-cultivated on solid MS medium with 200 μM acetosyringone in the dark for 3 days, followed by culture on selection medium for 2 weeks gave the highest transient expression of *gus* gene at 100% . The hygromycin-resistant embryogenic callus was obtained at 63.89% and developed to form somatic embryo at 4 embryos/culture after 8 weeks of culture on selection medium. Polymerase chain reaction (PCR) analyse confirmed the presence of *gus* gene at size of 441 bp and *hpt* gene at size of 800 bp.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความเมตตากรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ความเข้าใจ และสอนทักษะในด้านต่าง ๆ ทั้งในด้านการเรียน และการใช้ชีวิตในสังคมปัจจุบัน ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตรจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ อบรม สั่งสอน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณสำหรับความรักความอบอุ่น การอบรมสั่งสอน และกำลังใจที่ดีจากคุณสมโชค และคุณไรหนาบ เย็นช้อน พ่อแม่ที่รักยิ่ง และนายสุรินทร์ เย็นช้อน น้องชายสุดที่รัก ญาติสนิทมิตรสหาย พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ร่วมทำกิจกรรมกันมา โดยเฉพาะสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกคน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน เป็นกำลังใจ ให้ความรักความเอาใจใส่เสมอมา ตลอดจนทุกสิ่งทุกอย่างที่ดลบันดาลให้ผู้วิจัยได้ทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุรีรัตน์ เย็นช้อน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	17
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	18
วัสดุ อุปกรณ์	18
วิธีการ	23
3 ผล	28
4 วิจารณ์	50
5 สรุป	58
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียน	77

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม	9
2	ผลของซีโฟทาซีมต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	29
3	ผลของไฮโกรมัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	34
4	ผลของแหล่งที่มาของชิ้นส่วนต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	35
5	ผลของชนิดสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	38
6	ผลของอายุเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	40
7	ผลของความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	43
8	ผลของความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	44
9	ผลของความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อจำนวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (SE) หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	45

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ	6
2	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันวางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	18
3	ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์	29
4	ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	30
5	ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์	31
6	ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์	32
7	ผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	33
8	ผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	34
9	การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA 1304 และวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	36
10	ลักษณะแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 เป็นระยะเวลา 4 เดือน	36

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 และ EHA105 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	39
12	การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุต่าง ๆ หลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	41
13	การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่ความหนาแน่นเชื้อ (OD_{600}) และระยะเวลาการจุ่มแช่ที่ 2 4 6 12 ชั่วโมงหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์	46
14	ปาล์มน้ำมันที่รอดชีวิตและสร้างโซมาติดเอ็มบริโอหลังการจุ่มแช่ในอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 (OD_{600}=0.8) เป็นระยะเวลาต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	47
16	การแสดงออกของยีน *gus* ของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม สายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 หลังวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	48
17	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* (ก) และ *hpt* (ข) โดยเทคนิค PCR	49

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัญหาทางการเกษตรในการผลิตพืชที่สำคัญในปัจจุบันคือ ผลผลิตทางการเกษตรที่ได้ยังไม่พอเพียงและตรงตามความต้องการทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร ปัญหาจากโรคแมลงศัตรูพืชรวมทั้งความไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การปรับปรุงพันธุ์จึงถูกนำมาใช้เพื่อการผลิตพืชให้ได้คุณลักษณะตามต้องการ ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จากสถานการณ์ปัจจุบันประเทศไทยกำลังประสบปัญหาวิกฤติพลังงานต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในปริมาณมาก การพัฒนาพลังงานทดแทนจากพืชจึงเป็นเรื่องจำเป็น ประเทศไทยมีการปลูกพืชน้ำมันหลายชนิดแต่ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูง มีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ โดยพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ พันธุ์เทเนอรา ซึ่งมีเปลือกสำหรับอัดน้ำมันมาก และให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง (บุษบา, 2548) จึงเหมาะสมในการนำมาผลิต น้ำมันไบโอดีเซล ประเทศไทยผลิตปาล์มน้ำมันได้เพียง 4 % ของผลผลิตทั้งโลก ผลผลิตเฉลี่ย 2.8 ตันต่อไร่ต่อปี เปอร์เซ็นต์น้ำมัน 15 - 17 % ซึ่งถือว่าค่อนข้างต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศมาเลเซียซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 5 - 6 ตันต่อไร่ต่อปี เปอร์เซ็นต์น้ำมัน 25-26 % (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2551) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ปริมาณน้ำมันสูง ต้านทานต่อโรคและแมลงและทนทานต่อสภาพแวดล้อมนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีการดั้งเดิม (conventional breeding) ด้วยวิธีผสมพันธุ์ระหว่างพืชปลูกกับพืชพันธุ์ที่มีลักษณะดี แล้วให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตามกลไกทางธรรมชาติ ทำการคัดเลือกจนได้พืชปลูกที่มีลักษณะดีตามต้องการมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ในการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ต้องใช้ระยะเวลานาน ถ้าพ่อพันธุ์แม่พันธุ์มีความแตกต่างทางสายพันธุ์มากโอกาสที่จะสำเร็จก็จะน้อยลง (Rajanaidu and Jalani, 1995 อ้างโดย Chowdhury *et al*., 1997) ในการปฏิบัติอาจได้ ลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่ต้องการรวมเข้ามาด้วย รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญต่าง ๆ อาจมาจากยีนที่อยู่ในพืชพันธุ์พื้นเมืองหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่สามารถนำมาผสมกับพืชปลูกที่ต้องการได้ ปัจจุบันพัฒนาการทางวิทยาศาสตร์

ก้าวหน้ามากขึ้น เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชจึงถูกนำมาใช้เพื่อ สร้างพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการ และลดข้อจำกัดที่เกิดขึ้นของวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ซึ่งการถ่ายยีนเข้าสู่พืชเป็นกระบวนการตัดต่อยีนทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป วิธีการนี้ทำให้ได้สายพันธุ์ใหม่ในระยะเวลาอันสั้นและสามารถนำยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งถ่ายฝากให้กับสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้ (กวิยา, 2549) การปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืชเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชที่รวดเร็วและให้ผลที่แน่นอน วิธีการนี้จึงเป็นที่นิยมของนักปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการปลูกถ่ายยีนมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย วิธีการที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนประสบผลสำเร็จสูง ซึ่งวิธีการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันที่ได้รับความนิยมคือ การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และการใช้อะโกรแบคทีเรียม แต่ละวิธีการก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป (สุรินทร์, 2548) Parveez และคณะ (1998) รายงานการศึกษาปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ส่วนการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนั้นยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงของเชื้อกับพืชอาศัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ดังนั้นการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเพื่อเป็นแนวทางการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การตรวจเอกสาร

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชเป็นวิธีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืชให้แสดงออกในลักษณะที่ต้องการ โดยการส่งถ่ายสารพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์และสามารถแทรกตัวในจีโนมของพืชได้ ส่งผลให้เกิดการแสดงออกในลักษณะที่สารพันธุกรรมเหล่านั้นควบคุม รวมทั้งสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมนั้นไปยังรุ่นลูกได้ โดยทั่วไปวัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ประการแรก ได้แก่ ความต้องการนำยีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์เข้าสู่โครโมโซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพืชที่มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค ทั้ง พืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ ประการที่สอง เพื่อ การศึกษาให้เกิดความเข้าใจในกลไก หรือการทำงานของยีนหรือกระบวนต่างๆ ทางชีววิทยา โดยเมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้วและยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืช ก็จะสามารถอธิบายหรือแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีน และกระบวนการที่เกิดขึ้นในพืชได้

ระดับหนึ่ง ทั้งนี้รวมถึงการศึกษาในด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ดินด้วยยีนเดี่ยว หรือยีนจำนวนน้อยที่นำมาใช้ถ่ายเข้าสู่พืช เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ยีนควบคุมแมลงศัตรูพืช ยีนต้านทานไวรัสพืช ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช ยีนควบคุมการสุกของผลไม้ ยีนเปลี่ยนสีกลีบดอกไม้ ยีนควบคุมคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดพืช และยีนควบคุมการผสมตัวเอง เป็นต้น ส่วนพืชเศรษฐกิจชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานผลสำเร็จในการถ่ายยีน และยีนดังกล่าวทำงานได้เมื่อเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืช ได้แก่ มะเขือเทศ (Romero, *et al*., 2001) ยาสูบ (Krugel *et al*., 2002) คาโนลา (Cardoza and Stewart, 2003) ฝ้าย (Zhao *et al*., 2006) ถั่วเหลือง (Yan *et al*., 2000) ข้าวโพด (Sidorov *et al*., 2006) และ อ้อย (Manickavasagum *et al*., 2004) เป็นต้น ทั้งนี้คาดว่าการถ่ายยีนให้กับพืชมีข้อได้เปรียบบางประการ เช่น สามารถผลิตพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีที่ใช้วิธีการผสมพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมทำไม่ได้ สามารถเปลี่ยนแปลงข้อด้อยบางอย่างของพันธุ์พืชที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถเพิ่มคุณค่าหรือคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ทางการค้าให้แก่พืช (พิสสวรรณ, 2550)

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจัดเป็นเทคโนโลยีการผลิตพืชที่สามารถรองรับการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการต่างๆ เช่นการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทั้งการใช้สารเคมีและการฉายรังสี และอีกวิธีการหนึ่งซึ่งได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การถ่ายยีนเข้าสู่พืช สามารถปฏิบัติได้หลายวิธีการ ขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน วิธีการถ่ายยีนสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีการใหญ่ๆ คือ

1. การถ่ายยีนโดยตรง เป็นการนำเอาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

1.1 การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากพืช นำมาบ่มร่วมกับสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ ร่วมกับสารเคมีที่นิยมใช้คือสารละลาย polyethylene glycol (PEG) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ และจากคุณสมบัตินี้จึงนำมาใช้ในการชักนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืช

1.2 การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า เป็นการถ่ายยีนโดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรงในระดับที่ทำให้เซลล์เกิดช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อรับเอาโมเลกุลดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถถ่ายยีนให้กับเซลล์ที่ยังมีผนังเซลล์ได้ด้วย นอกเหนือจากโปรโตพลาสต์

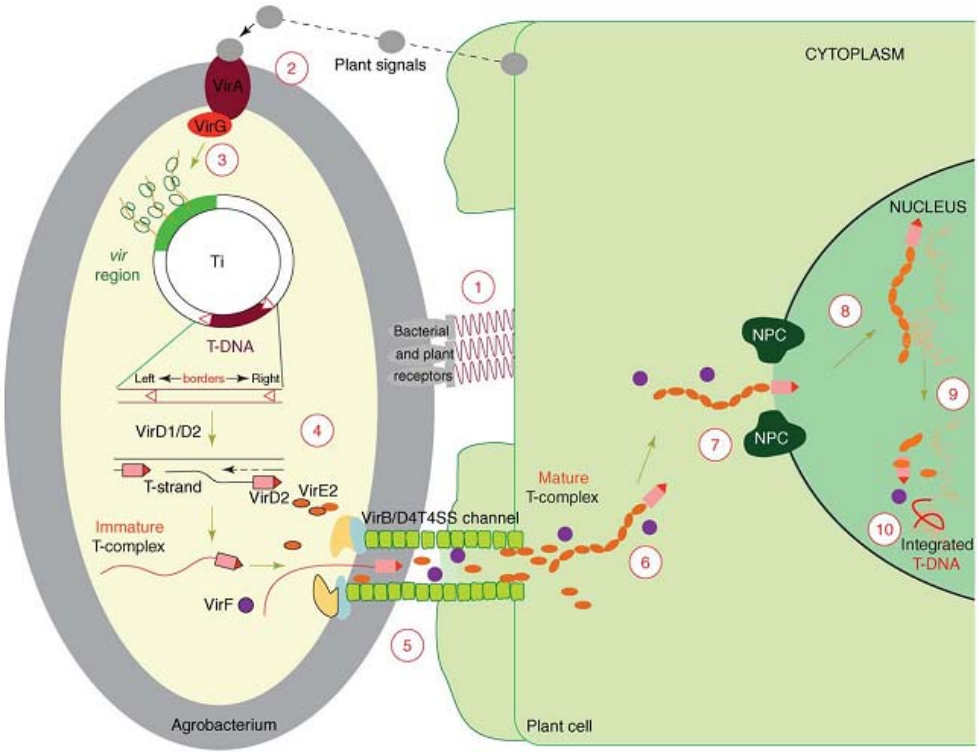
1.3 การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีด เป็นการถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดขนาดเล็ก ฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง แต่เนื่องจากเซลล์พืชมีแวคิวโอล การฉีดจึงต้องระมัดระวัง เพราะอาจฉีดโดนแวคิวโอลแตกส่งผลให้เซลล์ตายได้

1.4 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค เป็นการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซในการขับเคลื่อนอนุภาคโลหะที่เคลือบผิวภายนอกไว้ด้วยดีเอ็นเอที่จะถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งอนุภาคโลหะที่นิยมใช้คือ ทังสเตน และ ทอง อนุภาคจะแทรกผ่านผนังเซลล์และนำเอาดีเอ็นเอที่เคลือบไว้เข้าไปด้วย

2. การถ่ายยีนโดยอ้อม เป็นการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งอะโกรแบคทีเรียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน อะโกรแบคทีเรียมที่นิยมนำมาใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens* และ *A. rhizogenes* โดย *A. rhizogenes* มีพลาสมิดที่เรียกว่า Ri-plasmid (root inducing plasmid) สามารถบุกรุกเข้าสู่พืชแล้วทำให้เกิดรากลอย (hairy root) จำนวนมาก เรียกว่า hairy root disease ส่วน *A. tumefaciens* มีพลาสมิด เรียกว่า Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) สามารถบุกรุกเข้าสู่พืชได้บริเวณที่มีบาดแผลแล้วทำให้เกิดปุ่มปมที่เรียกว่า crown gall disease โดย Ti-plasmid ที่พบมากมี 2 ชนิด คือ ออกโทปีน (octopine) และโนปาลีน (nopaline) เมื่ออะโกรแบคทีเรียมส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณนั้นจะสามารถสร้างสารโอปีน (opine) ขึ้นได้ตามชนิดของ Ti-plasmid ส่วนเชื้ออะโกรแบคทีเรียมก็สามารถเจริญได้โดยใช้สารโอปีนเป็นแหล่งพลังงาน แม้จะกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมออกไปแล้ว พืชยังคงสามารถสังเคราะห์สารโอปีนได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร เมื่อ T-DNA เข้าไปรวมอยู่ในโครโมโซมพืชแล้วยีน oncogenic gene (*onc*) ซึ่งอยู่บน T-DNA สามารถแสดงออกได้สูงส่งผลให้ปริมาณฮอร์โมนของพืชเปลี่ยนแปลงไป เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และไม่จำกัดจนเกิดเป็นลักษณะปุ่มปม ที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ (Stanton, 2003) การนำ T-DNA มาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชจะต้องตัดเอายีน *Onc* ออกจาก T-DNA ส่วนขอบเขตของ T-DNA ที่จะสามารถส่งไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่าแขนซ้าย (left border : LB) และแขนขวา (right border : RB) โดยกลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีน *virulence* ที่อยู่ใน Ti-plasmid ซึ่งประกอบด้วยยีน *vir A vir G vir D vir C vir E* และ *vir B* กลไกการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชคล้ายกับการจับคู่ของแบคทีเรีย กระบวนการส่งถ่ายถูกกระตุ้นโดยสารประกอบฟีนอลจากพืช ซึ่งได้แก่สาร acetosyringon (AS) เป็นสารที่พืชปล่อยออกมาเมื่อเกิดบาดแผล และควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และยีน *vir* ที่อยู่บน Ti-plasmid ทั้งนี้ T-DNA จะถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *vir D* ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในรูปแบบของ DNA สายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตแขนขวาไปเรื่อย ๆ ส่วนนี้เป็นส่วนที่

จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตแขนซ้ายทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของ DNA ที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าจะไม่มีส่วนแขนซ้าย การส่ง T-DNA ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอน เพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม ส่วนสำคัญที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียมไปยังเซลล์พืช คือ ส่วนของยีน *vir* และตำแหน่งของ RB และ LB ของ T-DNA ส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน และฮอร์โมนที่อยู่ภายใน T-DNA นั้น ไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่าย T-DNA แต่อย่างใด ดังนั้นการใช้ Ti-plasmid ในการส่งถ่ายยีนทำได้โดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช และสารโอปีนด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อมีการส่งถ่าย T-DNA เข้าไปในพืช พืชจะได้รับยีนที่สอดใส่ไว้แทน (สุรินทร์, 2548)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชสามารถทำได้หลายวิธีการ ขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน ซึ่งการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นที่นิยมมากกว่าเทคนิคอื่น ๆ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย (Hiei and Komari, 2008) Tzfira และ Citovsky (2006) ได้สรุปลำดับขั้นตอนการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมไว้ดังนี้ คือ *Agrobacterium* บุกรุกเซลล์พืช จากนั้นพืชตอบสนองโดยการหลั่งสารพวกฟีนอลส่งสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของยีน *virA* และ *virG* โปรตีน VirD1 และ VirD2 ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง RB และ LB เกิด T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) จากนั้นโปรตีน VirD2 จะเข้าไปจับที่ตำแหน่งปลาย 5’ ของเส้น T-DNA สารประกอบเชิงซ้อนของ VirE2/VirE1 จะเข้าไปจับรอบ ๆ เส้น T- DNA สายเดี่ยว เพื่อป้องกัน T-DNA ถูกทำลายในระหว่างการส่งผ่านเข้าไปในไซโตพลาสซึมของพืช ซึ่งโปรตีน VirB ทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายช่องบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้ T-DNA สามารถผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่ ไซโตพลาสซึมของพืช และแทรกตัวเข้าสู่นิวเคลียสของพืช (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กระบวนการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ
ที่มา : Tzfira and Citovsky (2006)

ยีนในกระบวนการส่งถ่ายเข้าสู่พืช

ในระบบการปลูกถ่ายยีน โครงสร้างของชิ้นยีนที่ปลูกถ่ายต้องมีส่วนที่สำคัญคือ ยีนควบคุมการแสดงออกหรือโปรโมเตอร์ (promoter genes) ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker genes) และ ยีนรายงานผล (reporter genes)

ยีนควบคุมการแสดงออก หรือ โปรโมเตอร์

ยีนแต่ละยีนที่จะถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช ต้องมีส่วนของโปรโมเตอร์ซึ่งเป็นส่วนของ DNA ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป เป็นบริเวณที่เอนไซม์ RNA polymerase เข้ามาเกาะ และเริ่มถอดรหัสไปเป็น mRNA โปรโมเตอร์จะอยู่ในส่วน non-transcribed DNA ที่อยู่ทางด้าน upstream ของจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนมีหลายชนิด เช่น โปรโมเตอร์ที่ควบคุมการทำงานของยีนได้ตลอดเวลา และในเนื้อเยื่อทุกชนิด

(constitutive promoter) โปรโมเตอร์ที่ควบคุมการทำงานของยีนเฉพาะในเนื้อเยื่อชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น ส่วนใบ หรือ ราก (tissue/organ specific promoter) โปรโมเตอร์ที่สามารถควบคุมการทำงานของยีนเฉพาะช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งในระยะการเจริญเติบโตในวงจรชีวิตของพืช เช่น เฉพาะในระยะเมล็ดงอก หรือระยะที่พืชออกดอก (time specific promoter) โปรโมเตอร์ที่เปิดสวิทช์การทำงานของยีนได้ ภายใต้สภาพที่เหมาะสมและเฉพาะเท่านั้น เช่น ภายใต้อุณหภูมิ ช่วงแสง ความชื้นต่ำหรือสภาพที่พืชเกิดบาดแผลเนื่องจากความสามารถในการควบคุมการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน (regulated promoter) เป็นต้น (จรัสศรี, 2548)

โปรโมเตอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการถ่ายยีน คือ nos promoter เป็น promoter จากยีน nopaline synthase ส่วน CaMV 35S promoter เป็นโปรโมเตอร์จากไวรัสที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบด่างของดอกกะหล่ำ (cauliflower mosaic virus) (สุรินทร์, 2548) มีคุณสมบัติที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่ และเป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ทุกเนื้อเยื่อและแสดงออกตลอดเวลา

ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก

ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกมักใช้ยีนที่ก่อให้เกิดความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืช เพื่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีน ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการถ่ายยีน ซึ่งแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืชที่ปลูกถ่าย ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกที่นิยมใช้ในกระบวนการถ่ายยีนได้แก่ ยีน *npt*II แยกมาจากส่วน transposon Tn5 ของเชื้อ แบคทีเรีย *Escherichia coli* สร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase สามารถลดความเป็นพิษของสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside พวก kanamycin, geneticin, paramomycin และ neomycin ทำให้สามารถเลือกใช้สารปฏิชีวนะให้เหมาะกับชนิดพืชที่นำมาใช้ในกระบวนการถ่ายยีนได้ ส่วนยีน *bar* สร้างเอนไซม์ phosphinothricin acetyltransferase (PAT) ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinothricin, bialaphos เป็นสารที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthase ที่ใช้ในกระบวนการ Aminonia assimilation มีประสิทธิภาพสูงในการคัดเลือกเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยว ยีน *hpt / hph* แยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (HPT) เป็นเอนไซม์ลดความเป็นพิษของ hygromycin B (Hm) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม aminoglycoside antibiotic ที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน พืชที่ใช้

hygromycin B เป็นสารคัดเลือก ได้แก่ ยาสูบ Arabidopsis ข้าวโพด ข้าว พืชตระกูลหญ้า อื่น ๆ เป็นต้น

ยีนรายงานผล

ยีนรายงานผล เป็นยีนที่ใช้ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเทคนิคในการถ่ายยีน และใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงลักษณะความต้านทาน สามารถตรวจสอบการแสดงออกได้โดยตรงบนเนื้อเยื่อเป้าหมาย ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้แก่ ยีน *gusA* (*uidA*) ที่เป็นยีนสร้างเอนไซม์ ß-glucuronidase (GUS) ได้จากเชื้อ *E. colli* สายเชื้อ K12 ใช้ตรวจสอบกับสารตั้งต้นในปฏิกิริยาด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น spectometric (p-nitrophenyl-ß-D-glucuronidase), fluorometric (4-methylumbelliferyl glucuronide) และ histochemical assay คือ ทำปฏิกิริยากับสาร X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoly-glucuronidase) ผลที่ได้จะแสดงออกในรูปสารสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืชที่มียีน (Jefferson *et al*., 1987) สามารถทำการตรวจสอบได้ง่าย มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนี้อาจมียีน *gfp* จากแมงกระพรุน (*Aequra victoria*) สามารถสังเคราะห์โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein: GFP) ในเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน ตรวจสอบโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง UV หรือแสงสีฟ้า (blue light) ไม่สร้างความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเป้าหมาย นิยมใช้เป็นยีนรายงานผลในกระบวนการถ่ายยีนทั้งในพืชและในสัตว์

การใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีข้อจำกัดในเรื่องของความจำเพาะเจาะจงของเชื้อกับพืชอาศัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งไม่ได้เป็นพืชอาศัยในธรรมชาติของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม แต่ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดได้สำเร็จ (ตารางที่ 1) ซึ่งความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งส่วนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ชิ้นส่วนพืช ขั้นตอนในการเลี้ยงที่สมบูรณ์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

พืช	สายเชื้อ (พลาสมิด)	ยีนรายงานผล	ยีนคัดเลือก	ชิ้นส่วน	การถ่ายยีน (%)	อ้างอิง
ข้าว	LBA4404 (pBI121)	*gus*	*npt*II	mature embryo	4.0	Nazim-Ud-Dowla *et al*., 2008
ข้าวโพด	LBA4404 (pBI121)	*gus*	*npt*II	embryogenic callus	1.5-8.0	Degefu and Hanif, 2003
อ้อย	AGL1 (pPJUb2)	*gus*	*npt*II	callus	100	Joyce *et al*., 2010
ข้าวสาลี	LBA4404 (pBI121)	*Gus*	*npt*II	immature embryo	11.94	Ding *et al*., 2009
ข้าวฟ่าง	LBA 4404 (pCAMBIA1304)	*gus*	*hpt*	immature embryo	5.0	Nguyen *et al*., 2007
ลิลลี่	EHA105 (pIG121-Hm)	*Gus*	*hpt*	callus	4.29	Ogaki *et al*., 2008
หอมใหญ่	LBA4404 (pART27-mgfp-ER)	*mgfp*-ER	*hpt*	immature leaf	79.7	Kenel *et al*., 2010

ปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมนั้น มีปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนหลายประการ ทั้งในส่วนของชิ้นส่วนพืช สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และพลาสมิด ตลอดจนกระบวนการในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ มีระดับที่เหมาะสมแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดดังนี้

1 ชิ้นส่วนพืช

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนจำเป็นต้องมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นพืชที่ติดดอกออกผลได้ ซึ่งสิ่งที่ควรคำนึงถึงในการคัดเลือกชิ้นส่วนคือสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่าง

ต่อเนื่อง มีอัตราการเจริญและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ในเวลาไม่นาน ชิ้นส่วนที่มีการศึกษาในการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม ได้แก่ ปลายยอด เซลล์ซัสเพนชั่น แคลลัส เป็นต้น แหล่งที่มาของชิ้นส่วนก็มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เช่น การศึกษาการถ่ายยีนในข้าวฟ่างพบว่า เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่จากต้นในแปลงปลูกให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าจากต้นในโรงเรือนอนุบาล (Zhao *et al*., 2000)

อายุชิ้นส่วนพืชที่ต่างกันส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนแตกต่างกัน Hoque และคณะ (2005) ศึกษาการถ่ายยีนโดยใช้แคลลัสข้าวสายพันธุ์ Moulata อายุ 3 6 9 และ 12 สัปดาห์ เลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มี พลาสมิด pTOK233 พบว่า แคลลัสที่อายุ 3 สัปดาห์ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด แคลลัสอายุมากขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ลดลง Tazeen และ Mirza (2004) ถ่ายยีนในถั่วเขียวโดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อน ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และราก ที่ตัดจากต้นกล้าอายุ 2 3 และ 4 วัน พบว่า การใช้ชิ้นส่วนพืชที่ตัดจากต้นกล้าอายุ 2 วันให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด และลดลงเมื่อใช้ชิ้นส่วนพืชจากต้นกล้าอายุมากขึ้น

ในกรณีของสายพันธุ์พืชนั้น แม้ว่าจะเป็นพืชในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดก็ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่างกัน Saharan และ คณะ (2004) ศึกษาการถ่ายยีน ในข้าวชนิด indica สองสายพันธุ์คือ HKR-46 และ HKR-126 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 105 พบว่า ในสายพันธุ์ HKR-126 มีอัตราการแสดงออกของยีน *gus* 44.4% สูงกว่าสายพันธุ์ HKR-46 ซึ่งให้การแสดงออกของยีน *gus* เพียง 28.9% Moyal Ben Zvi และคณะ (2008) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนใน *Gypsophilla paniculata* L. 3 สายพันธุ์ คือ Arbel Flamingo และ Pestival โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pKIWI105 พบว่า สายพันธุ์ Arbel ให้การแสดงออกของยีน *gus* 90% สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งนี้เนื่องจากความยากง่ายในการส่งถ่ายยีนและความสามารถในการสร้างสารประกอบพวกฟีนอลของพืชที่เป็นตัวกระตุ้นการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์ของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Karami *et al*., 2009)

2 สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และพลาสมิด

การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมมักมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงระหว่างเชื้อ และพืชอาศัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งไม่ได้เป็นพืชอาศัยตามธรรมชาติของอะโกรแบคทีเรียม สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีการศึกษาการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ สายเชื้อ EHA 101 (Toki, 1997) สายเชื้อ EHA 105 (Ali *et al*., 2007; Saharan *et al*., 2004) และสาย

เชื้อ LBA 4404 (Hiei and Komari, 2006; Rao and Rao, 2007; Saharan *et al.*, 2004) การศึกษาสายเชื้อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชในแต่ละชนิดนับเป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความยากง่ายต่อการบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมแต่ละสายเชื้อแตกต่างกัน Rachmawati และคณะ (2004) เปรียบเทียบระหว่างเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 101 และ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pAFT14 ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวชนิด javanica สองสายพันธุ์ พบว่า การใช้สายเชื้อ EHA 101 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าสายเชื้อ LBA4404 ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ Song และ Sink (2004) ถ่ายยีนในบลูเบอร์รี่โดยเปรียบเทียบเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA105 GV3101 และ LBA4404 พบว่า สายเชื้อ EHA105 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้สูงสุด ส่วนสายเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงในข้าวโพดและข้าวฟ่าง คือ สายเชื้อ LBA4404 (Frame *et al*., 2002 อ้างโดย Cheng *et al*., 2004) นอกจากสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมแล้วชนิดพลาสมิดก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน Sharwat และคณะ (2006) ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ของข้าวบาร์เลย์ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 เปรียบเทียบพลาสมิด 2 ชนิด คือ pUGB7 และ pYF133 พบว่า พลาสมิด pYF133 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้สูงกว่า Zhangsun และคณะ (2007) รายงานการปลูกถ่ายยีน *Galanthus nivalis agglutinin* (*gnc*) เข้าสู่เอ็มบริโอจินิคแคลลัสของอ้อย โดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 3 สายเชื้อ คือ LBA4404 EHA105 และ A281 ซึ่งแต่ละสายเชื้อประกอบด้วย 6 พลาสมิด คือ pC10RG pC10UG pC20RG pC20UG pC30RG และ pC30UG พบว่า เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA105 และพลาสมิด pC10UG ให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดแสดงให้เห็นว่า การศึกษาถึงประสิทธิภาพของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิดที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดนั้นสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชได้

3 ความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการปลูกเชื้อ และการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ

ปริมาณเชื้อ และระยะเวลาการปลูกเชื้อมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ใช้ โดยปกติหลังการถ่ายยีนจะกำจัดเชื้อส่วนเกินออกไป ปริมาณเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้การกำจัดเชื้อให้หมดไปจากพืชได้ยากทำให้อัตราการถ่ายยีนต่ำและส่งผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามหากปริมาณเชื้อน้อยเกินไปก็อาจทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำด้วยเช่นกัน (เกศณี, 2546) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในพืชแต่ละชนิด Ali และคณะ (2007) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาการปลูกเชื้อที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์ Xiushi-11 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 พบว่า การปรับปริมาณความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียมโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 (OD_{600} = 0.6) ใช้เวลาในการปลูกเชื้อนาน 10 นาที ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด Pandey และคณะ (2010) ถ่ายยีนในโสมอินเดียโดยใช้ชิ้นส่วนใบจุ่มแช่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pIG121Hm ปรับความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ OD_{600} = 0.6 จุ่มแช่ชิ้นส่วนนาน 15 นาที ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ Gao และคณะ (2009) พบว่า การจุ่มแช่ชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ปรับความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ OD_{600} = 0.1 นาน 15 นาที ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด 44.7 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิด ชนิดของชิ้นส่วน และระยะเวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ มีระดับที่เหมาะสมแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด

การวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช ทั้งนี้จะต้องมีระยะเวลาที่เหมาะสม เพราะหากเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นระยะเวลานานเกินไปเชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากยากแก่การกำจัด และอาจส่งผลต่อความมีชีวิตและพัฒนาการของชิ้นส่วนพืชได้ ซึ่งการศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อถ้าใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง จากการศึกษาของ Hoque และคณะ (2005) เลี้ยงแคลลัสข้าวสายพันธุ์ Moulata ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTOK233 โดยเปรียบเทียบระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมที่ 1 2 3 4 และ 5 วัน พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด และเมื่อเลี้ยงร่วมเป็นเวลานานขึ้นมีแนวโน้มการแสดงออกของยีน *gus* ลดลง ในขณะที่ การเลี้ยงชิ้นส่วนใบของโสมอินเดียร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pIG121Hm เป็นระยะเวลา 1-6 วัน พบว่า การเลี้ยงร่วมที่ 5 วัน ให้ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน gus สูงสุด และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 6 วัน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลานานมากเกินไปจะส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน และมีผลให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลงได้

สารปฏิชีวนะในกระบวนการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

กระบวนการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมต้องใช้สารปฏิชีวนะในขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งการใช้สารปฏิชีวนะดังกล่าวอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนและศักยภาพในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชบางชนิดได้ โดยชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในกระบวนการถ่ายยีนนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่สำคัญสองประการคือ เพื่อกำจัดเชื้อส่วนเกินและคัดเลือกชิ้นส่วนพืชหลังการปลูกถ่ายยีน

1. สารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อส่วนเกิน

การใช้สารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกินหลังจากการปลูกถ่ายยีนนั้น นับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพราะถ้าไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากชิ้นส่วนพืชหลังการปลูกถ่ายยีนได้นั้น นอกจากจะไม่สามารถทำการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนได้แล้ว อาจส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชได้ หากต้องใช้สารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อเป็นระยะเวลานาน สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อส่วนเกินหลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และชนิดและชิ้นส่วนพืช เกศณี (2546) ทดสอบผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีม และไทเมนทิน ต่อการเจริญของชิ้นส่วนใบเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ วีเอฟ 134-1-2 และความสามารถในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 พบว่าสารปฏิชีวนะไทเมนทินความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการกำจัดเชื้อส่วนเกินในมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์ สุภาวดี (2548) ใช้สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมกำจัดเชื้อส่วนเกินหลังการถ่ายยีนออกจากโปรโตคอร์ม กล้วยไม้กะเร่กะร่อนปากเป็ด พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตรอดของโปรโตคอร์มน้อยที่สุด ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นนี้สามารถกำจัดเชื้อ อะโกรแบคทีเรียมได้ Wu และคณะ (2005) ใช้สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในแคลลัสของ ryegrass หลังการปลูกถ่ายยีน

นอกจากนี้มีรายงานว่า สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมมีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ และในระดับความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำการเกิดยอดในพืชบางชนิดได้ เช่นการศึกษาของ กาญจนา (2551) พบว่าสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มสร้างยอดรวมได้สูงสุด 7.13 ยอดต่อชิ้นส่วน ทั้งนี้ผลของสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นรวมไป

ถึงชนิดและชิ้นส่วนพืชด้วย จึงต้องมีการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อลดผลกระทบต่อชิ้นส่วนพืชในกระบวนการถ่ายยีน

2. สารปฏิชีวนะในการคัดเลือก

ในขั้นตอนของการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน การใช้สารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับชนิด ของพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีนว่าในส่วนของ T-DNA มียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดใด โดยส่วนใหญ่แล้ว พบว่าพลาสมิดส่วนใหญ่ที่นิยมใช้จะมียีน *hpt* และ *npt*II ซึ่งแสดงออกในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและคานามัยซิน ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของสารที่จะนำมาใช้ขึ้นอยู่กับชนิด และสายพันธุ์พืช รวมทั้งชนิดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ด้วย เช่น ใบ ลำต้น ราก หรือ แคลลัส เป็นต้น เพราะชิ้นส่วนแต่ละชนิดต้านทานต่อสารปฏิชีวนะต่างกัน Darlington และคณะ (2009) ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคานามัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสและยอดของ selenium-hyperaccumulator จากการเพาะเลี้ยง ราก ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยง พบว่าสารปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนรากให้การสร้างแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรชิ้นส่วนทั้งสามชนิดไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนในพืชชนิดนี้ Khanna และ Raina (1999) Rachmawati และคณะ (2004) Hoque และคณะ (2005) Kumar และคณะ (2005) และ ลาวัลย์ (2543) พบว่าอาหารที่เติม ไฮโกรมัยซินความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งทำให้แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญและพัฒนาได้ และจากการศึกษาของ Zhao และคณะ (2008) ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ *Suaeda salsa* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมในการคัดเลือกชิ้นส่วนเนื่องจากสามารถยับยั้งการสร้างแคลลัสของพืชชนิดนี้ได้ Abdullah และคณะ (2005) พบว่าสารปฏิชีวนะคานามัยซินที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 50 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนเอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ของปาล์มน้ำมัน แต่ในกรณีของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินนั้นพบว่า เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ไม่รอดชีวิตหลังวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ไม่รอดชีวิตหลังวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

การทดสอบชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน ว่าส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตหรือการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชอย่างไรนับว่าสำคัญ เพราะจะได้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้พลาสมิดที่มียีนคัดเลือกที่เหมาะสมกับพืชที่เราต้องการศึกษาได้

การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน

เมื่อเซลล์พืชได้รับยีนเข้าไปภายในเซลล์ภายในเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ เรียกการแสดงออกนี้ว่า transient expression ซึ่งวิธีการตรวจสอบขึ้นอยู่กับยีนรายงานผลที่เลือกใช้ และสำหรับการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะมียีนคัดเลือก ซึ่งทำให้เซลล์พืชดังกล่าวเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารบางชนิดที่สอดคล้องกับคุณสมบัติของยีนคัดเลือกนั้น ทำให้สามารถแยกเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีนได้ ส่วนการตรวจสอบว่าแต่ละต้นพืชที่พัฒนาได้มียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่ในโครโมโซมหรือไม่ นิยมทำโดยการสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบหายีนเป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) (Chai *et al.,* 1994; Knapp *et al.,* 2000; Li *et al.,* 2005) หรือเทคนิค southern blot hybridization (Men *et al.,* 2003; Mishiba *et al.,* 2005) นอกจากนี้อาจตรวจสอบคุณภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในแปลงทดลองเพื่อประเมินคุณภาพระหว่างต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

การปลูกถ่ายยีนในปาล์มน้ำมัน

Chowdhury และคณะ (1997) ศึกษาชนิดของโปรโมเตอร์ที่มีความเหมาะสมต่อการแสดงออกของยีน *gus* โดยทำการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน พบว่า โปรโมเตอร์ *Emu* (a recombinant truncated maize alcohol dehydrogenase l) ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* ได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโมเตอร์ *Ubi*1 (maize ubiquitin l) *Act*l (rice actin l) 35S (cauliflower mosaic virus 35S) และ *Adh*l (maize alcohol dehydrogenase)

Parveez และคณะ (1998) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ชิ้นส่วนคัพภะปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนยิง และ 4 ชั่วโมงหลังยิง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ 1.50 ไมโครกรัม เคลือบอนุภาคทองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตรร่วมด้วยแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5

โมลาร์ และสเปอร์มิดีน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 900-1100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แรงดันสุญญากาศ 27 นิ้วปรอท และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายเท่ากับ 11 เซนติเมตร ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* เป็นเวลา 2 วันหลังจากยิงยีนเป็นสภาพที่เหมาะสมที่สุด Lee และคณะ (2006) ศึกษาการถ่ายยีน *Cry*1A(b) เข้าสู่เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ของปาล์มน้ำมันอายุ 9-11 สัปดาห์หลังจากผสมเกสร ด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ 2.50 ไมโครกรัม เคลือบอนุภาคทอง 3 มิลลิกรัม ร่วมด้วยแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 โมลาร์ และสเปอร์มิดีน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 900 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายเท่ากับ 6 เซนติเมตร พบการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *gus* 81-100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน และตรวจพบการคงอยู่ของยีน *Cry*1A(b) ด้วยวิธี PCR จากการศึกษาข้างต้นเขาสรุปว่า การถ่ายยีนด้วยวิธีการดังกล่าวขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางชีวภาพ

การถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียมนั้น Abdullah และคณะ (2005) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่คัพภะปาล์มน้ำมันด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA1301 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือกในพืช บ่มเชื้อร่วมกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 30 นาที และเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด พบว่า มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงถึง 64.4% ส่วนคัพภะปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* Masli และคณะ (2008) ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1300bUba ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยการตรวจสอบการต้านทานต่อสาร Basta และยืนยันผลด้วยการทำ PCR Dot blot และ Southern blot Fuad และคณะ (2008) ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ของปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 เปรียบเทียบชนิดของพลาสมิด 3 ชนิดคือ pAF2 (binary vector) pAF4 (super binary vector) และพลาสมิด pMR505 (เป็นพลาสมิดเปรียบเทียบ) พบว่า การแสดงออกของยีน *gus* แตกต่างกันในแต่ละพลาสมิด โดยพลาสมิด pAF2 ให้การแสดงออกของยีน *gus* 52.6-85.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพลาสมิด pAF4 ให้การแสดงออกของยีน *gus* 70.5-96.7 และพลาสมิด pMR505 ให้การแสดงออกของยีน *gus* 80.9-93.8 เปอร์เซ็นต์

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการถ่ายยีนเป็นวิธีการที่รวดเร็วและให้ผลที่แน่นอน ปัจจุบันวิธีการนี้จึงเป็นที่นิยมของนักปรับปรุงพันธุ์พืช อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายยีนเป็นวิธีการที่มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย จากรายงานการศึกษาการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันข้างต้นจะเห็นได้ว่าการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคนั้นได้มีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทาง

เคมี และปัจจัยทางชีวภาพที่เหมาะสมแล้ว ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการและปัจจัยเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมก่อนที่จะปลูกถ่ายยีนที่ต้องการนั้นเป็นสิ่งสำคัญและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อความมีชีวิต และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อศึกษาปัจจัยชีวภาพที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

บทที่ 2

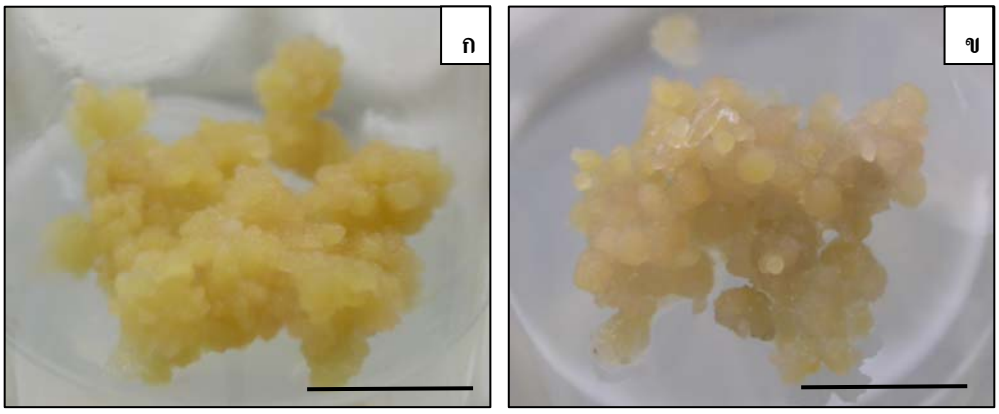
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่เป็นเวลา 2 ปี (โคลนกระบี่) (ภาพที่ 2 ก) และชักนำจากใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันจากสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา เป็นเวลา 9 ปี (โคลนเทพา) (ภาพที่ 2 ข) แคลลัสจากทั้งสองแหล่งย้ายเลี้ยงทุก ๆ เดือนจนครบเวลาดังกล่าว บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไดแคมบา ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารข้างต้นปรับค่าความเป็นกรดด่าง 5.7 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรและกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิต (บาร์=10 มิลลิเมตร)
ก โคลนกระบี่ ข โคลนเทพา

1.2 เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 สายเชื้อ คือ สายเชื้อ AGL-1 และสายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 pCAMBIA1302 และ pCAMBIA1304 แต่ละพลาสมิดมียีน *gus* อยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ nopaline synthase polyadenylation (Nos polyA) เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* อยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ CaMV35S polyadenylation (CaMV35S polyA) เป็นยีนคัดเลือก โดยที่ยีน *gus* ในพลาสมิด pCAMBIA1301 มีบริเวณที่ตัดได้โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่ง (Gus first exon และ GusA second exon) และพลาสมิด pCAMBIA1304 มีทั้งส่วนของยีน *gus* และ ยีน *gfp* รายละเอียดโครงสร้างพลาสมิดทั้งสามแสดงในภาคผนวกที่ 8 9 และ 10

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS
- สารควบคุมการเจริญเติบโตไดแคมบา และกรดแอสคอร์บิค
- น้ำตาลซูโครส
- วุ้น

1.3.2 สารเคมีที่เป็นองประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม
- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร LB
- สารปฏิชีวนะ คานามัยซิน ซีโฟทาซีม และ ไฮโกรมัยซิน

1.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS คือ
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-glucuronic acid (X-Gluc)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Sodium phosphate
- Triton X – 100
- Methanol 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

1.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
- Tris EDTA (TE) buffer

- Sodium dodecyl sulphate (SDS)
- Ammonium acetate
- Isopropanol
- Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

1.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

- Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP)
- เอนไซม์ *Taq* polymerase
- ไพรเมอร์
- DNA template

1.3.6 สารเคมีที่ใช้ทำอิเล็คโตรโฟรีซิส

- Tris-borate-EDTA (TBE) buffer
- Agarose gel
- Loading dye
- Marker DNA
- Ethidium bromide

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ตู้อบไมโครเวฟ
- หม้อนึ่งความดันไอ
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ ฟลาสค์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
- ลูปสำหรับเขี่ยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม
- ชุดเครื่องมือ ประกอบด้วย ปากคีบ และมีดผ่าตัด

- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- ชั้นวางเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิและแสง

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายยีน สกัดดีเอ็นเอ และทำอิเล็คโตรโฟรีซีส

- ตู้บ่มเชื้อ
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
- ไมโครไปเปต
- ชุดกรองมิลิพอร์สำหรับกรองสารปฏิชีวนะ
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- โกร่งบดตัวอย่างและหลอดเอฟเพนดอร์ฟ
- เครื่อง PCR
- เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส
- Gel documentation
- กล้องถ่ายรูป

3. การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งสูตร Luria and Bertani broth (LB) เติมคานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 2 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้มาปรับความหนาแน่นของเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมอะซิโตไซริงกอนความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ก่อนนำไปเลี้ยงร่วมกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

4. การตรวจสอบการปลูกถ่ายยีน

4.1 การตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยการวิเคราะห์กิจกรรมของยีน *gus*

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ตามวิธีการของ Jefferson และคณะ (1987) โดยสุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจากการถ่ายยีนมาใส่ในไมโครเพลท

96 หลุม (96-well) บ่มในสารละลายตั้งต้นของ เอนไซม์ GUS (ß-glucuronidase) ซึ่งประกอบด้วย X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide) ใน DMSO (dimethyl sulfoxide) เข้มข้น 10% และ $NaPO_4$ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เติมส่วนผสมของสารละลาย X-Gluc ให้ท่วมชิ้นส่วน นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ออกแล้วเติมเมทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% ทำซ้ำจนกว่าสารละลายใสหรือมองเห็นจุดสีน้ำเงิน

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน 8 สัปดาห์ ประมาณ 0.05 กรัม น้ำหนักสด มาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Te-chato (2000) เก็บตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟ เติม TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 150 ไมโครลิตร (Tris-HCl 20 mM pH 8.0 และ EDTA 0.1 mM) เติมโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสตอนบนใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตรวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที กลับหลอดเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นดีเอ็นเอตกตะกอนอยู่ก้นหลอด เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ตากให้แห้ง จากนั้นเติม TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยวิธี PCR ก่อนทำ PCR นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris-acetic acid-ethylenediaminetetraacetic acid) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยเอธีเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.3 การตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

นำ ดีเอ็นเอ ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *hpt* คือ F-primer 5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3' และ R-primer 5'-AAGACCAATGCGGAGCATATA-3' ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *gus* คือ F-primer 5'-CTGCGACGCTCACACCGATAC-3' และ R-primer 5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3' ให้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอขนาด 441 คู่เบส ปฏิกิริยา PCR ใช้ดีเอ็นเอของพืช 10 นาโนกรัม ดีเอ็นเอของ พลาสมิด pCAMBIA1304 10 นาโนกรัม (ชุดควบคุม) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dNTP เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 2.0 ยูนิต ทำปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่จำเพาะสำหรับแต่ละยีน (รายละเอียดการทำปฏิกิริยา PCR แสดงใน ภาคผนวกที่ 3) เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดลง นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีม

1.1 สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่ออัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.7 เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมเข้มข้น 0 100 150 200 250 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส วางเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละจานเพาะเลี้ยงวางเลี้ยง 9 กลุ่มกลุ่มละ 20 แคลลัส คิดเป็น 1 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซีมโดยใช้แผนการทดลอง

แบบ CRD (Completely Randomized Design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Ducan's New Multiple Range Test)

1.2 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาเลี้ยงร่วมกับสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 (OD_{600} =1.0) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปแช่ในอาหารเหลวเติมซีโฟทาซีมความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยอาหารเหลวอีก 5 นาทีเพื่อเจือจางความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีม หลังจากนั้นซับด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมเข้มข้น 0 100 150 200 250 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตรวางเลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละจานเพาะเลี้ยงวางแคลลัส 5 กลุ่ม ๆ ละ 15-20 แคลลัส คิดเป็น 1 ซ้ำ ตรวจนับการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมหลังวางเลี้ยงทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซีม

2. ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่ออัตรารอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.7 เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละจานเพาะเลี้ยงวางเลี้ยง 9 กลุ่มกลุ่มละ 20 แคลลัส คิดเป็น 1 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. ศึกษาปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

3.1 ผลของแหล่งที่มาของชิ้นส่วนพืช

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากใบอ่อนของต้นปาล์มโคลนเทพา และ โคลนกระบี่บ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ปรับความหนาแน่นเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) บนอาหารสูตร MS เติมอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมากำจัดเชื้อส่วนเกินโดยการแช่ในอาหารเหลวเติมซีโฟทาซีมความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยอาหารเหลวอีก 5 นาที จากนั้นซับด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมซีโฟทาซีมความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ คัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละจานเพาะเลี้ยงวางเลี้ยง 9 กลุ่มกลุ่มละ 30-40 แคลลัส คิดเป็น 1 ซ้ำ หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทาน ไฮโกรมัยซินโดยการตรวจนับความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ตามวิธีการในข้อ 4.1 เปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วนโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

3.2 ผลของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และพลาสมิด

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 3.1 อายุ 4 สัปดาห์ บ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 2 สายเชื้อคือ EHA105 และ AGL-1 ซึ่งแต่ละสายเชื้อมีพลาสมิด 3 ชนิดคือ pCAMBIA1301 pCAMBIA1302 และ pCAMBIA1304 ปรับความหนาแน่นของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 บ่มชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาซับด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำมาเลี้ยงร่วมบนอาหารสูตร MS เติมอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อส่วนเกินและคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสตามวิธีการในการทดลองที่ 3.1 วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส โดยวาง

เลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร 10 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 20 – 25 แคลลัส มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ตามวิธีการในข้อ 4.1 และหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยคำนวณจากจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอต่อจำนวนทั้งหมดที่วางเลี้ยง เปรียบเทียบกันในแต่ละสายเชื้อโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.3 ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 3.1 วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ หลังการย้ายเลี้ยงมาบ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงในการทดลองที่ 3.2 ซึ่งปรับความหนาแน่นของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาซับด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำมาเลี้ยงร่วมบนอาหารสูตร MS เติมอะซิโตไซริงกอนความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อส่วนเกินและคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสตามวิธีการในการทดลองที่ 3.1 วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร 10 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 20 – 25 แคลลัส มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ตามวิธีการในข้อ 4.1 และหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยคิดจากจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอต่อจำนวนทั้งหมดที่วางเลี้ยง เปรียบเทียบกันในแต่ละอายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. 4 ความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วน และระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 3.1 และอายุเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ให้ประสิทธิภาพสูงในการทดลองที่ 3.3 มาบ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองที่ 3.2 ที่ความหนาแน่นเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 บ่มชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง และนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาซับด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำมาเลี้ยงร่วมบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 2 3 และ 5 วัน หลังจากนั้นกำจัดเชื้อส่วนเกินและคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสตามวิธีการในการทดลองที่ 3.1 วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส โดยวางเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหาร 10 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หลอด หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 20 – 25 แคลลัส มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ตามวิธีการในข้อ 4.1 และหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยคิดจากจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอต่อจำนวนทั้งหมดที่วางเลี้ยงเปรียบเทียบกันในแต่ละปัจจัยโดยใช้แผนการทดลองแบบ 4x4x3 factorial in CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT และตรวจสอบการปลูกถ่ายยีนในระดับโมเลกุลโดยการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 4.2 และตรวจสอบยีน *gus* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ตามวิธีการในข้อ 4.3

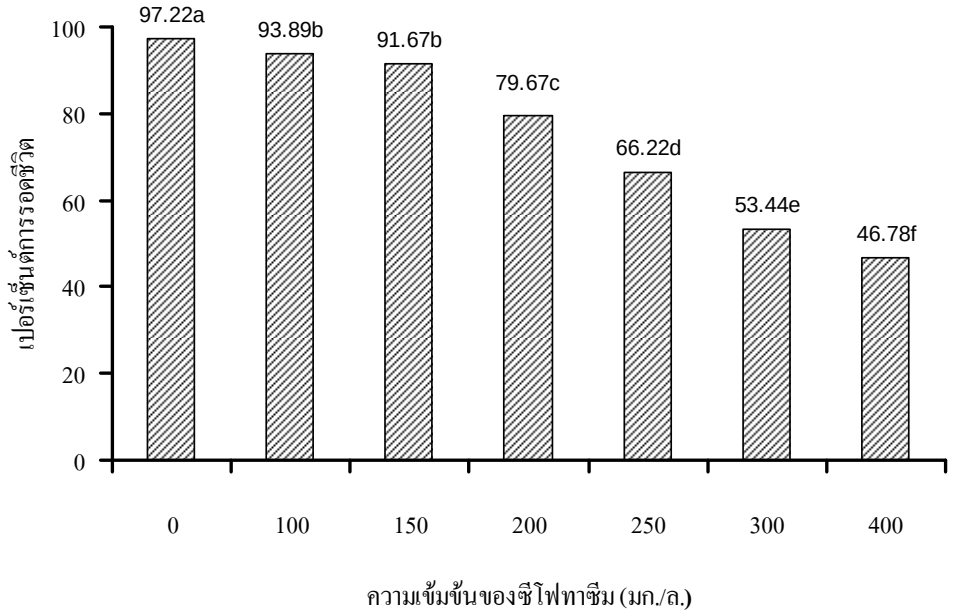
บทที่ 3

ผล

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีม

1.1 สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่ออัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 ร่วมกับสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมความเข้มข้น 0 100 150 200 250 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ลดลงตามความเข้มข้นของซีโฟทาซีมที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 97.22% 93.89% 91.67% 79.67% 66.22% 53.44% และ 46.78% ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ส่วนพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสนั้นพบว่า เปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดในอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซีม การวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเติมซีโฟทาซีมที่ระดับความเข้มข้น 100 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 4) แต่เปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอลดลงเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารเติมซีโฟทาซีมที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น



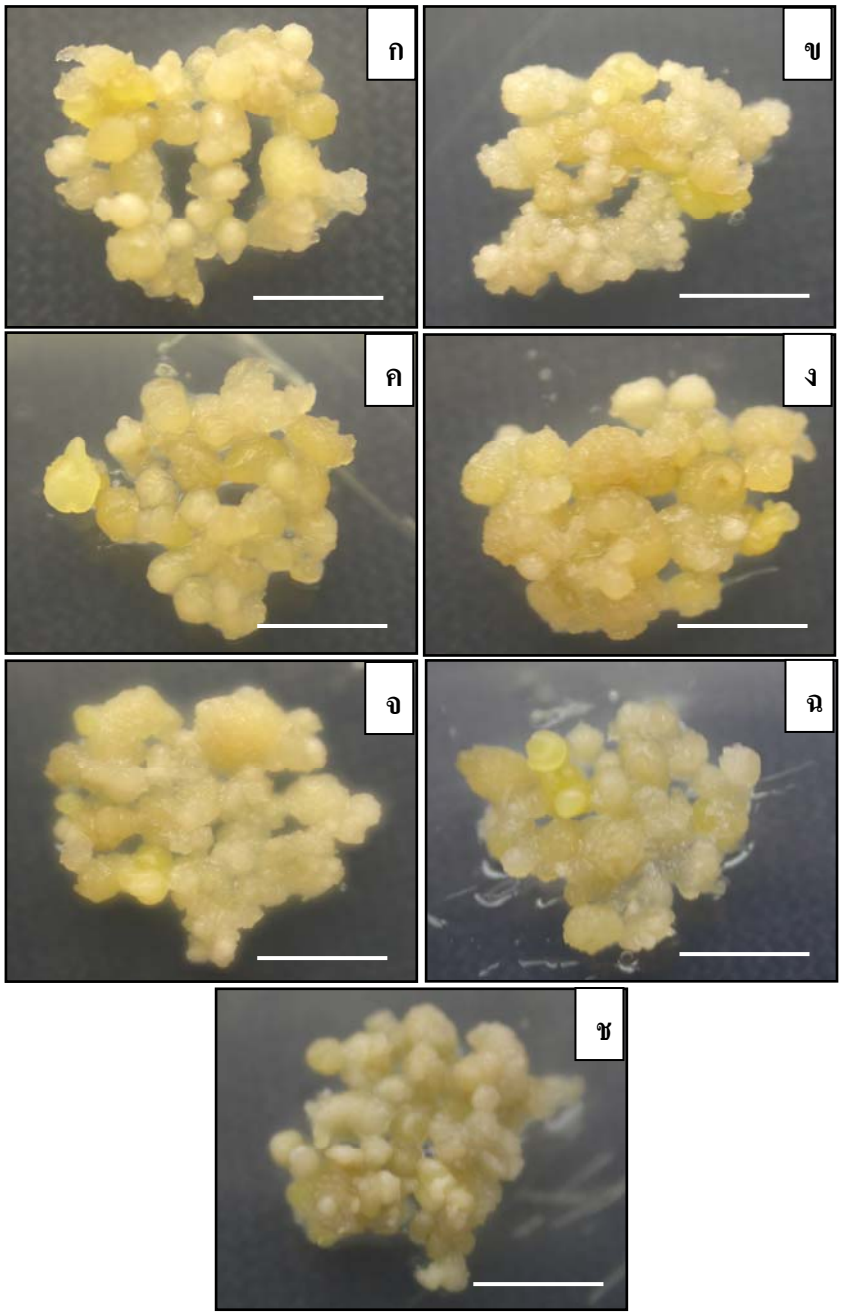
ภาพที่ 3 ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ตารางที่ 2 ผลของซีโฟทาซีมต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ซีโฟทาซีม (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การสร้าง SE	จำนวน SE/ชิ้นส่วน
0	37.77a	3.78a
100	35.55a	3.33ab
150	28.89ab	3.06ab
200	24.44ab	2.40bc
250	28.89ab	1.38cd
300	15.55bc	1.7cd
400	6.67c	0.6e
F-test	*	*
C.V. (%)	43.44	31.52

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

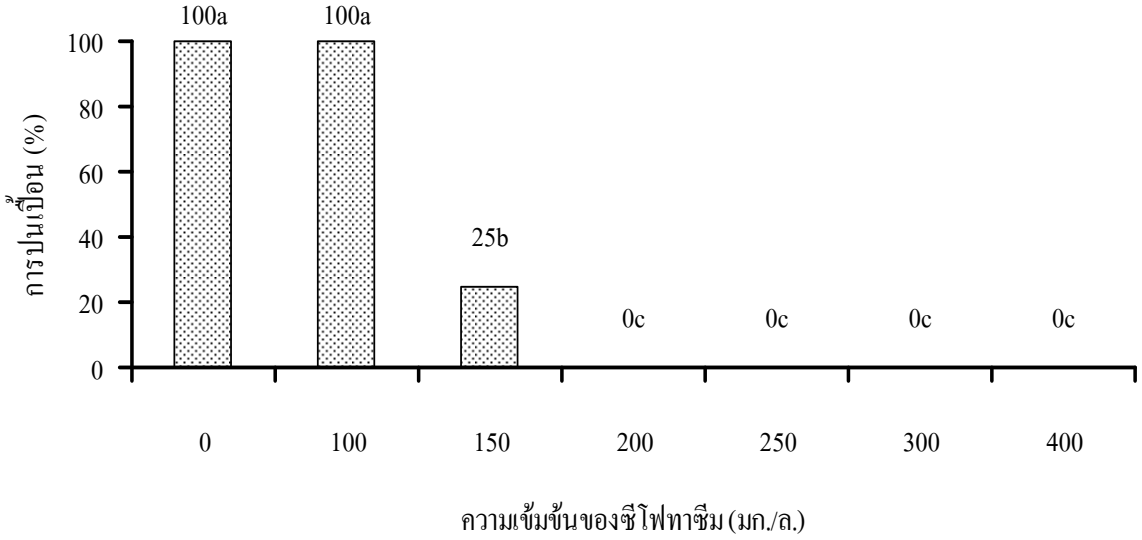


ภาพที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ 10 มิลลิเมตร)

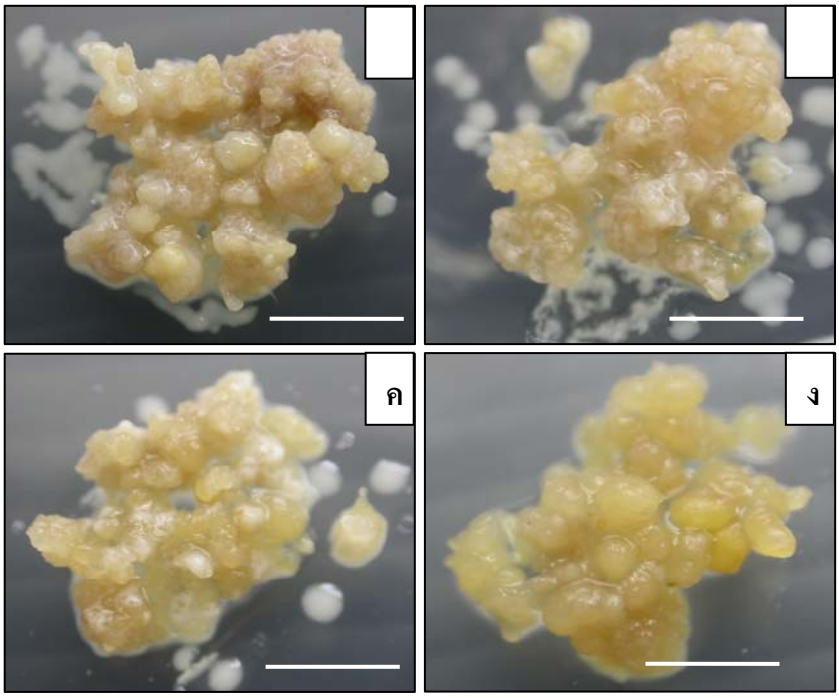
ก. 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ค. 150 มิลลิกรัมต่อลิตร
ง. 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จ. 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉ . 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
ช. 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังจุ่มแช่ในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและวางเลี้ยงบนอาหารเติมซีโฟทาซีมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เอ็มบริโอเจนิคที่วางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซีมเกิดการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 100 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม พบว่า ซีโฟทาซีมความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และซีโฟทาซีมที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้ (ภาพที่ 5) ซึ่งที่ความเข้มข้นดังกล่าวนี้ไม่ปรากฏโคโลนีของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม (ภาพที่ 6) จึงเลือกใช้ซีโฟทาซีมที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในขั้นตอนของการกำจัดเชื้อส่วนเกินหลังการปลูกถ่ายยีน



ภาพที่ 5 ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 (pCAMBIA1304) หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์



ภาพที่ 6 ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์ (บาร์ = 10 มิลลิเมตร)

ก อาหารไม่เติมซีโฟทาซีม

ข อาหารเติมซีโฟทาซีม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

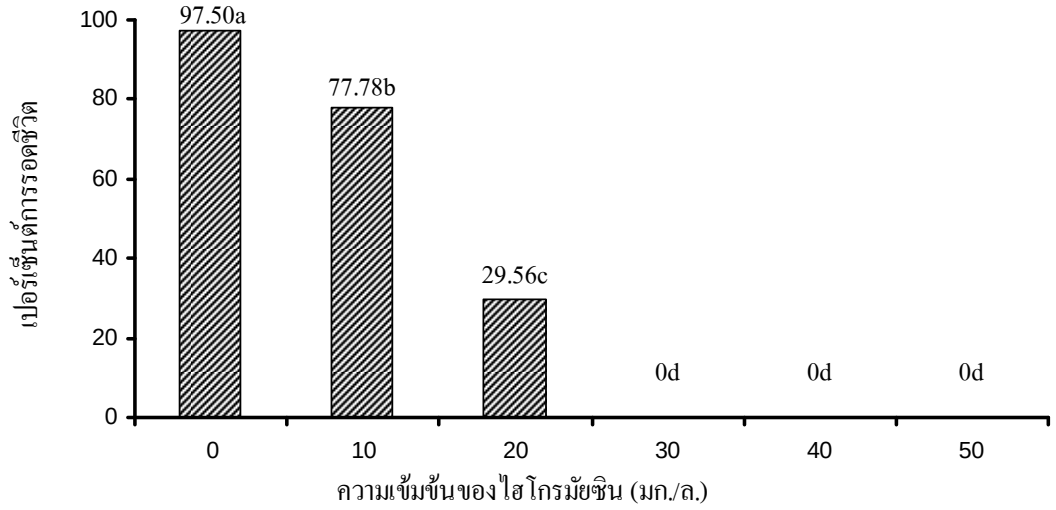
ค อาหารเติมซีโฟทาซีม 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง อาหารเติมซีโฟทาซีม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่ออัตรารอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยง เท่ากับ 97.58% 77.78% 29.55% ตามลำดับ และเมื่อวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่รอดชีวิต (ภาพที่ 7)

นอกจากนี้แล้วสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ยังมีผลต่อการพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารไม่เติมและเติม



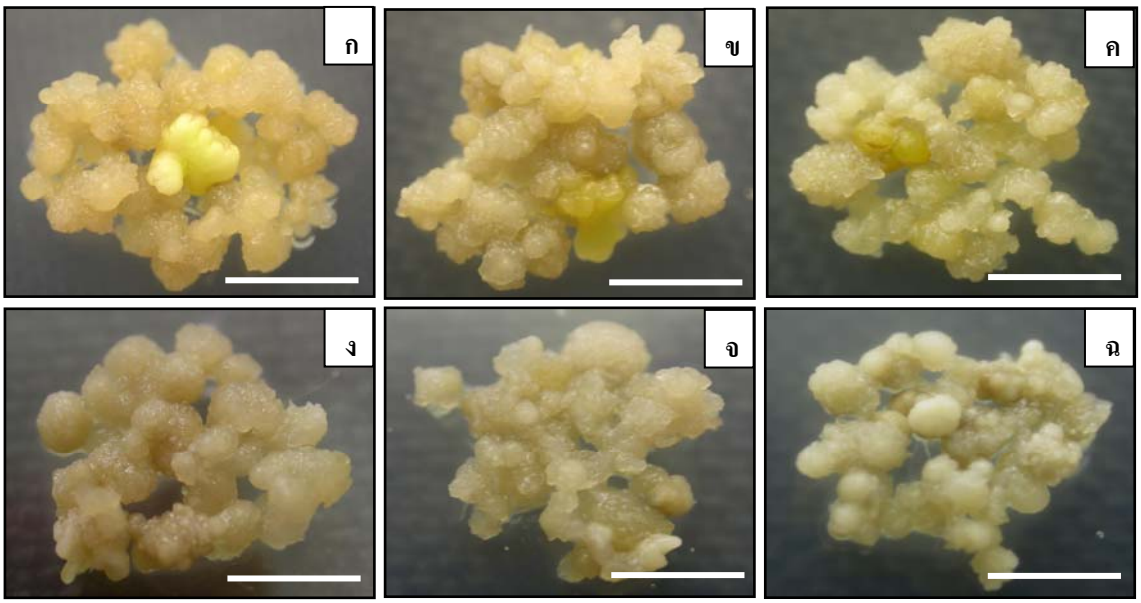
ภาพที่ 7 ผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ผลของไฮโกรมัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ไฮโกรมัยซิน (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การสร้าง SE	จำนวน SE/ชิ้นส่วน
0	48.88a	1.39b
10	42.22a	2.16a
20	42.22a	1.63b
30	0b	0c
40	0b	0c
50	0b	0c
F-test	*	*
CV (%)	71.29	27.34

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 8 ผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ =10 มิลลิเมตร)

ก. 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ข. 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ค. 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จ. 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉ. 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ศึกษาปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

3.1 ผลของแหล่งที่มาของชิ้นส่วนพืช

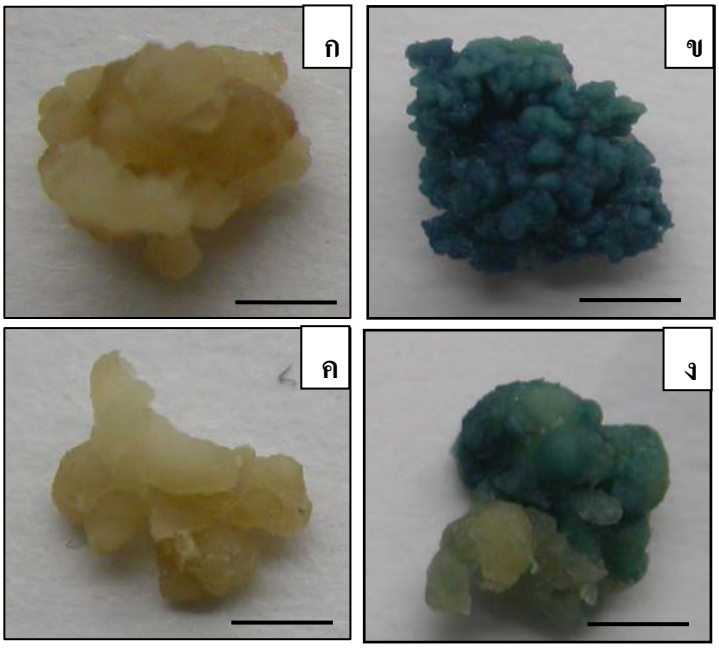
จากการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโคลนกระบี่ และโคลนเทพา ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายเชื้อ AGL-1 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1304 พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนกระบี่ให้อัตราการรอดชีวิต 72 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าโคลนเทพาซึ่งให้การรอดชีวิต 56 เปอร์เซ็นต์แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า แคลลัสโคลนกระบี่ให้การแสดงออกของยีน *gus* 100 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าโคลนเทพาซึ่งมีการแสดงออกของยีน *gus* 59.33 เปอร์เซ็นต์แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) และแคลลัสโคลนกระบี่ให้การติดสีน้ำเงินเข้มกว่าแคลลัสโคลนเทพา (ภาพที่ 9) แคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเมื่อนำมาคัดเลือกโดยการวางเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุกๆ เดือน เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า แคลลัสโคลนกระบี่มีการสร้างและเพิ่มปริมาณของแคลลัสชุดใหม่ แต่แคลลัสโคลนเทพามีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 10) จึงเลือกแคลลัสโคลนเทพาในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการส่งถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งที่มาของชิ้นส่วนต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

แหล่งชิ้นส่วน	การแสดงออกของยีน *gus* (%)	อัตรารอดชีวิต (%)
กระบี่	100a	72a
เทพา	59.33b	56b
$LSD_{0.05}$	19.04	14.58
C.V. (%)	16.39	15.62

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($0.01<p<0.05$)

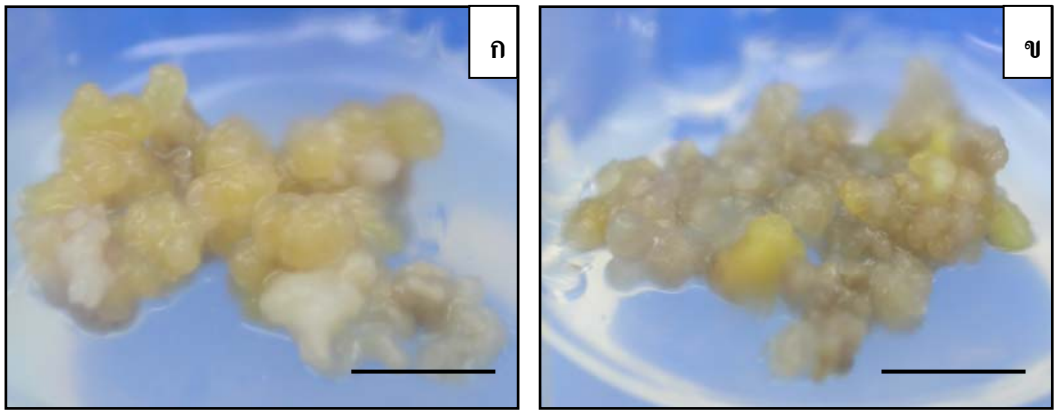
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD



ภาพที่ 9 การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 และวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 2.5 มิลลิเมตร)

ก แคลลัสโคลนกระบี่ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ข แคลลัสโคลนกระบี่ที่ได้รับการถ่ายยีน

ค แคลลัสโคลนเทพาที่ไม่ได้ถ่ายยีน ง แคลลัสโคลนเทพาที่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 10 ลักษณะแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 เป็นระยะเวลา 4 เดือน (บาร์ = 10 มิลลิเมตร)

ก แคลลัสโคลนกระบี่ ข แคลลัสโคลนเทพา

3.2 ผลของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และพลาสมิด

การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 และ EHA105 แต่ละสายเชื้อประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA1301 pCAMBIA1302 และ pCAMBIA 1304 ปรับความหนาแน่นเชื้อโดยวัดค่า OD_{600} เท่ากับ 0.6 เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงและเลี้ยงร่วมบนอาหารแข็งสูตร MS เติมอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารที่เติมซีโฟทาซีมเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA1304 ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 87.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* 65.56 เปอร์เซ็นต์แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่สายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1301 EHA 105 pCAMBIA1304 AGL-1 pCAMBIA1302 และ EHA 105 pCAMBIA1302 ให้การแสดงออกของยีน *gus* 44.43 35.55 31.10 และ 28.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5) ลักษณะการติดสีน้ำเงินของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในแต่ละสายเชื้อมีลักษณะแตกต่างกัน มีทั้งติดสีน้ำเงินทั่วทั้งเนื้อเยื่อและติดสีน้ำเงินเป็นจุด ๆ ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่มีการติดสีน้ำเงิน (ภาพที่ 11) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือ ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุด 26.67 เปอร์เซ็นต์จากการเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 รองลงมาคือ สายเชื้อ EHA 105 pCAMBIA1301 ให้การรอดชีวิต 19.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของชนิดสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิดต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม	พลาสมิด	ลักษณะการติดสีน้ำเงิน	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต[2/]
control		-	0d	6.67c
	pCAMBIA1301	+	44.43c	9.33c
AGL-1	pCAMBIA1302	++	31.10c	7.33c
	pCAMBIA1304	+++++	87.77a	28.67a
	pCAMBIA1301	++++	65.56b	19.33b
EHA 105	pCAMBIA1302	+	28.89c	9.33c
	pCAMBIA1304	+++	35.55c	9.33c
F-test			*	*
C.V.(%)			22.30	54.82

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($0.01<p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

- ไม่ติดสีน้ำเงิน + ติดสีน้ำเงิน 1- 20% ++ ติดสีน้ำเงิน 21-40% +++ ติดสีน้ำเงิน 41-60% ++++ ติดสีน้ำเงิน 61-80% +++++ ติดสีน้ำเงิน 81-100% ของชิ้นส่วน

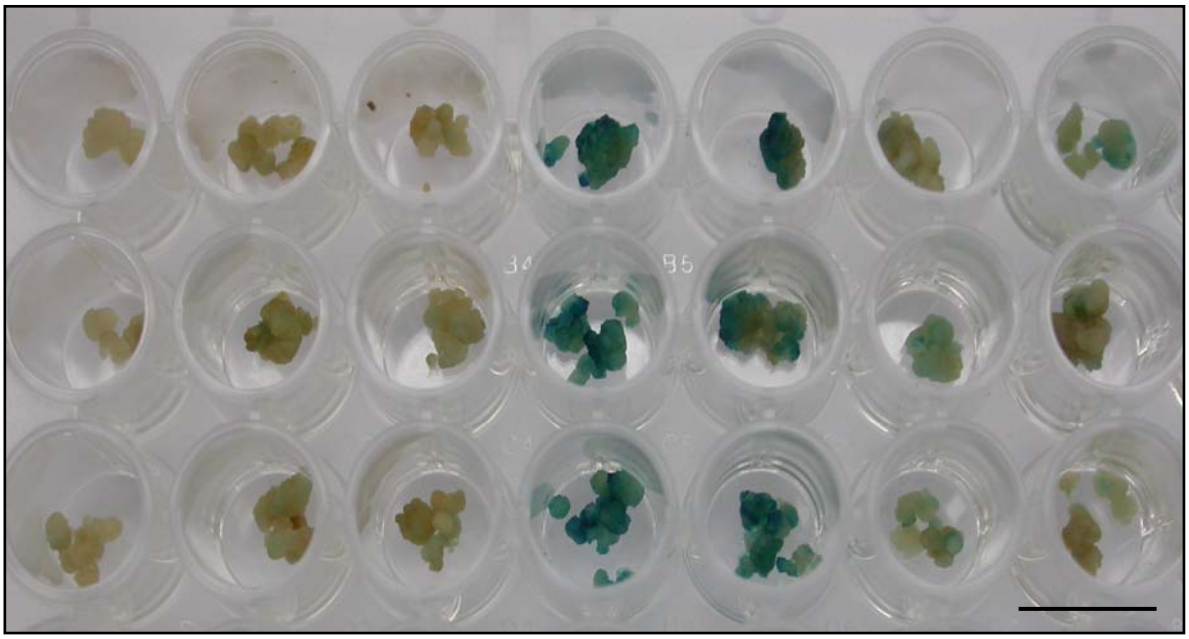
[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการถ่ายยีน 2 สัปดาห์

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน } gus = \frac{\text{จำนวน EC ที่ให้ผล } gus \text{ เป็น positive} \times 100}{\text{จำนวน EC ที่ตรวจสอบ}}$$

[2/] เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน 6 สัปดาห์

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนที่สร้าง SE} \times 100}{\text{จำนวนทั้งหมดที่วางเลี้ยง}}$$

ก ข ค ง จ ฉ ช



ภาพที่ 11 การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 และ EHA105 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 10 มิลลิเมตร)

ก ชุดควบคุม

ข AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301

ค AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1302

ง AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304

จ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301

ฉ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1302

ช EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304

3.2 ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ มาบ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ซึ่งมี พลาสมิด pCAMBIA1304 กำจัดเชื้อและวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก หลังถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบยีน *gus* พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 82.08 เปอร์เซ็นต์ และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ ให้การแสดงออกของยีน *gus* ต่ำสุด 60.21 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 6 ภาพที่ 12) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 36.88 เปอร์เซ็นต์ และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำสุด 23.75 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองนี้การใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่อายุมากขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

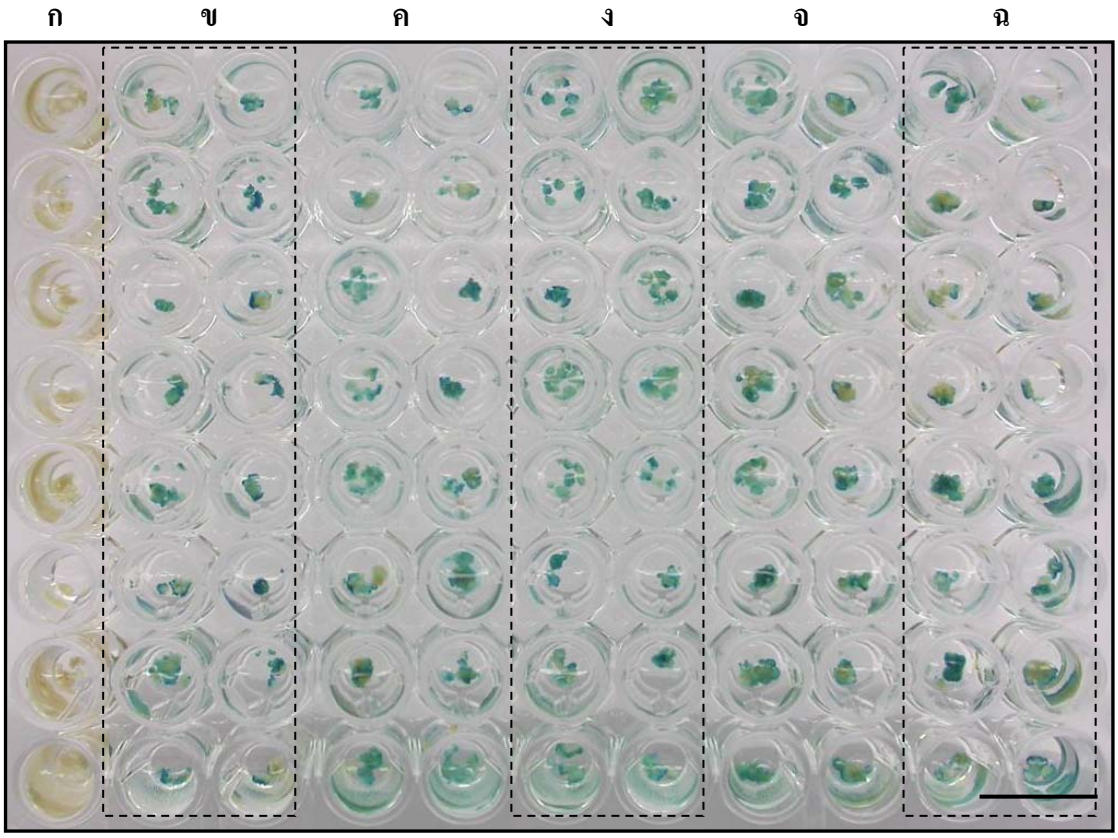
อายุเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (สัปดาห์)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต[2/]
2	75.63a	31.56ab
3	78.75a	29.55ab
4	82.08a	36.88a
5	75.51a	28.13ab
6	60.21b	23.75b
F-test	*	*
C.V. (%)	10.52	20.20

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธีDMRT

[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการถ่ายยีน 2 สัปดาห์

[2/] เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตหลังการถ่ายยีน 6 สัปดาห์



ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุต่าง ๆ หลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 10 มิลลิเมตร)

ก ชุดควบคุม

ข เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์

ค เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์

ง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์

จ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 5 สัปดาห์

ฉ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์

3.4 ความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วน และระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ภายหลังการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ มาบ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ปรับความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 จุ่มแช่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในสภาพเขย่าเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง และวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็งเติมอะซิโตไซริงกอนความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 2 3 และ 5 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อส่วนเกินและย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก หลังถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าการจุ่มแช่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมความหนาแน่นของเชื้อที่ค่า OD_{600}= 0.8 จุ่มแช่เป็นระยะเวลานาน 6 ชั่วโมงและเลี้ยงร่วมกันในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วันให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD_{600}= 0.4 จุ่มแช่เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงและเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 2 วันให้การแสดงออกของยีน *gus* ต่ำสุด 11.43 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 7) แต่ละชุดการทดลองให้การติดสีน้ำเงินแตกต่างกัน (ภาพที่ 13) หลังจากวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซินเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและจำนวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอต่อหลอดทดลองให้ผลในทำนองเดียวกันคือ การจุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ความหนาแน่นของเชื้อที่ OD_{600}= 0.8 เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 3 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 63.89 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8) และให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 4 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลองแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 9 ภาพที่ 14)

เมื่อพิจารณาในแต่ละปัจจัยพบว่า ความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมในแต่ละระดับ ให้การแสดงออกของยีน *gus* เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และอิทธิพลร่วมในแต่ละปัจจัยนั้นพบว่า ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีอิทธิพลร่วมกับระยะเวลาการจุ่มแช่ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน *gus* อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่ไม่มีผลต่อการสร้างและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (ภาคผนวกที่ 4 5 และ 6)

ตารางที่ 7 ผลของความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

ความหนาแน่นเชื้อ (OD_{600})	ระยะเวลาจุ่มแช่ (ชม.)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus***		
		ระยะเวลาการเลี้ยงร่วม (วัน)		
		2	3	5
0.4	2	11.43g	24.44fg	25.72fg
	4	50.00bcdef	28.89efg	46.67defg
	6	68.89abcd	100.00a	91.67ab
	12	48.89cdefg	91.67ab	88.89abc
0.6	2	66.67abcde	80.56abcd	72.22abcd
	4	61.67abcdef	88.89abc	72.22abcd
	6	72.22abcd	100.00a	91.67ab
	12	55.00bcdef	88.89abc	91.67ab
0.8	2	61.67abcdef	91.67ab	72.22abcd
	4	86.67abcd	100.00a	83.33abcd
	6	91.67ab	100.00a	91.67ab
	12	75.56abcd	100.00a	80.56abcd
1.0	2	63.89abcdef	75.00abcd	83.33abcd
	4	55.56bcdef	91.67ab	71.67ab
	6	63.89abcdef	100.00a	91.67ab
	12	86.67abcd	88.89abc	88.89abc

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 ผลของความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความหนาแน่นเชื้อ (OD_{600})	ระยะเวลาจุ่มแช่ (ชม.)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต*		
		ระยะเวลาการเลี้ยงร่วม (วัน)		
		2	3	5
0.4	2	0.00c	0.00c	0.00c
	4	11.11abc	11.11abc	8.33bc
	6	33.33abc	52.78abc	11.11abc
	12	19.44abc	38.89abc	11.11abc
0.6	2	30.55abc	41.67abc	22.22abc
	4	30.55abc	41.67abc	19.44abc
	6	41.67abc	55.56ab	63.89a
	12	22.22abc	52.78abc	11.11abc
0.8	2	41.67abc	30.55abc	30.56abc
	4	22.22abc	61.11ab	22.22abc
	6	52.78abc	63.89a	52.78abc
	12	22.22abc	22.22abc	11.11abc
1.0	2	22.22abc	22.22abc	33.33abc
	4	41.67abc	41.67abc	30.56abc
	6	41.67abc	41.67abc	22.22abc
	12	30.55abc	30.56abc	19.44abc

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($0.01<p<0.05$)

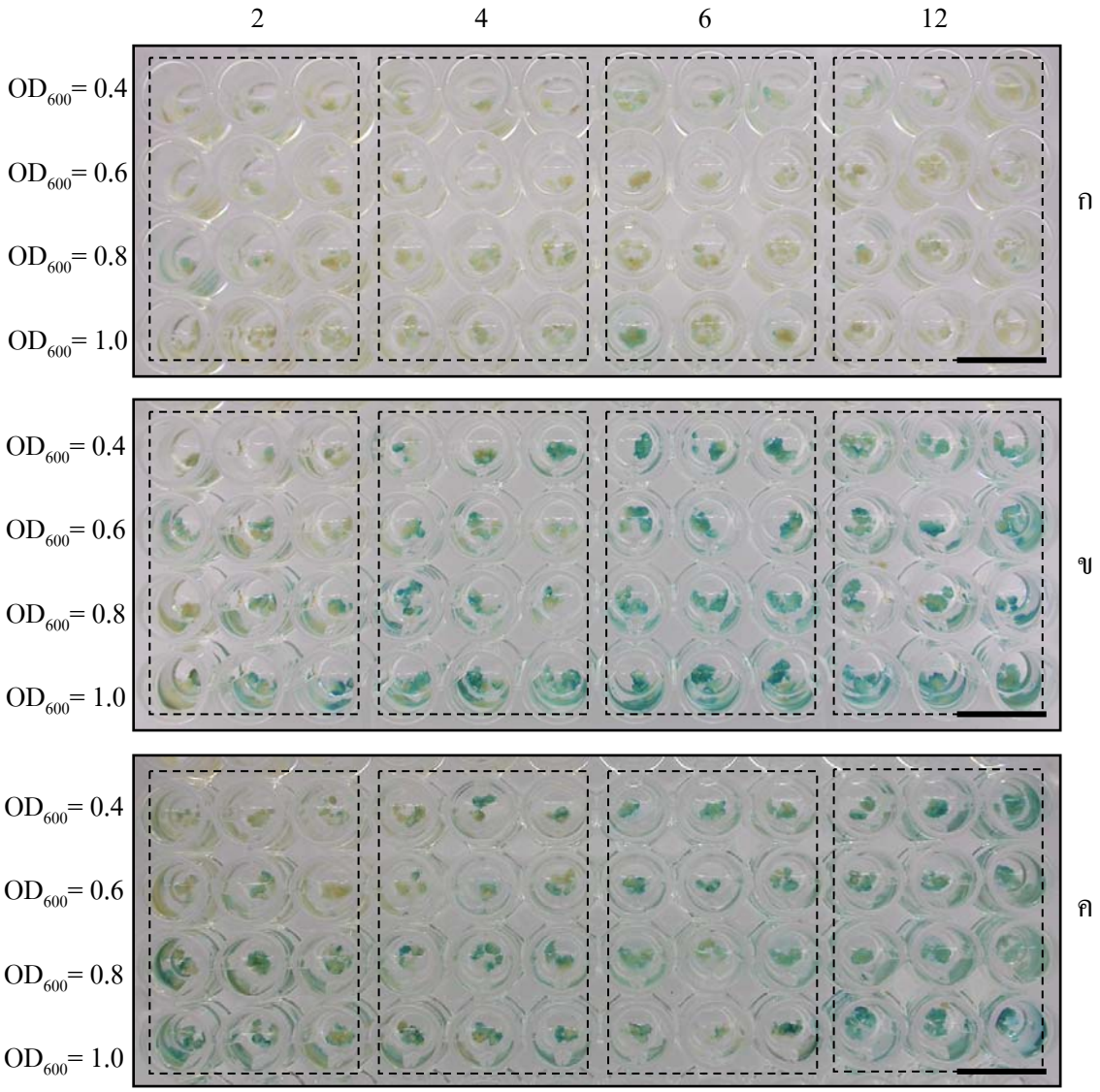
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 9 ผลของความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อจำนวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (SE) หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความหนาแน่นเชื้อ (OD_{600})	ระยะเวลาจุ่มแช่ (ชม.)	จำนวนการสร้าง SE ต่อหลอดทดลอง**		
		ระยะเวลาการเลี้ยงร่วม (วัน)		
		2	3	5
0.4	2	0.00d	0.00d	0.00d
	4	0.33dc	0.33dc	1.00abcd
	6	1.17abcd	1.56abcd	1.00abcd
	12	1.33abcd	1.83abcd	0.67bcd
0.6	2	1.33abcd	1.83abcd	1.00abcd
	4	1.00abcd	1.50abcd	1.00abcd
	6	2.17abcd	1.83abcd	3.00abcd
	12	2.67abcd	3.5ab	0.33dc
0.8	2	1.33abcd	1.67abcd	1.00abcd
	4	0.5bcd	3.06abcd	1.33abcd
	6	2.83abcd	4.00a	3.17abc
	12	0.5bcd	2.00abcd	0.67bcd
1.0	2	1.33abcd	1.00abcd	1.00abcd
	4	1.33abcd	2.00abcd	1.17abcd
	6	1.5abcd	2.67abcd	1.00abcd
	12	1.00abcd	0.83bcd	1.00abcd

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

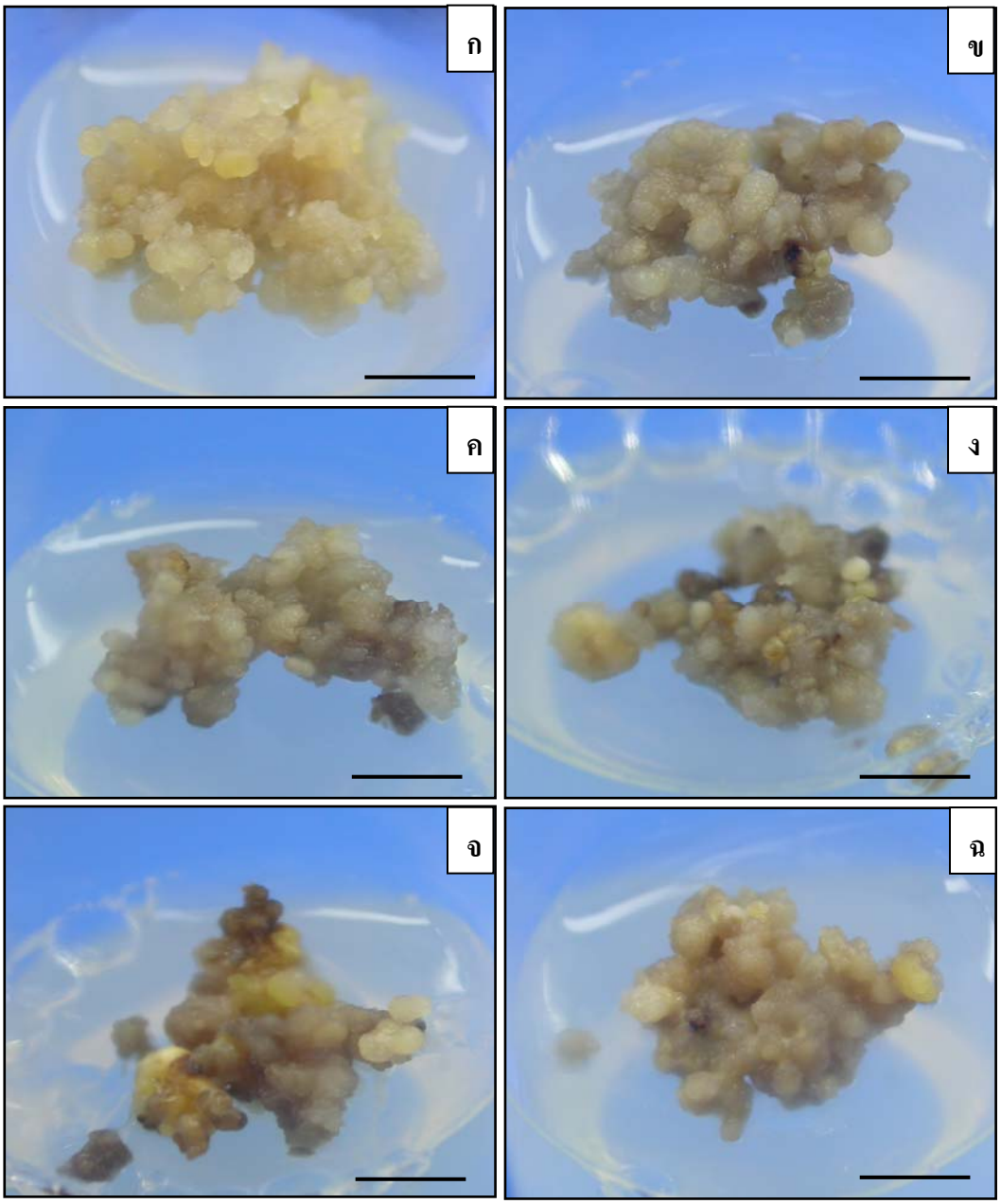


ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีน *gus* ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันหลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ที่ความหนาแน่นเชื้อ (OD_{600}) และระยะเวลาการจุ่มแช่ที่ 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 10 มิลลิเมตร)

ก เลี้ยงร่วมบนอาหารแข็งเป็นระยะเวลา 2 วัน

ข เลี้ยงร่วมบนอาหารแข็งเป็นระยะเวลา 3 วัน

ค เลี้ยงร่วมบนอาหารแข็งเป็นระยะเวลา 5 วัน



ภาพที่ 14 แคลลัสปาล์มน้ำมันที่รอดชีวิตและสร้างโซมาติดเอ็มบริโอหลังการจุ่มแช่ในอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMB IA1304 (OD_{600}=0.8) เป็นระยะเวลาต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 10 มิลลิเมตร)

ก ชุดควบคุมวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมไฮโกรมัยซิน

ข ชุดควบคุมวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไฮโกรมัยซิน

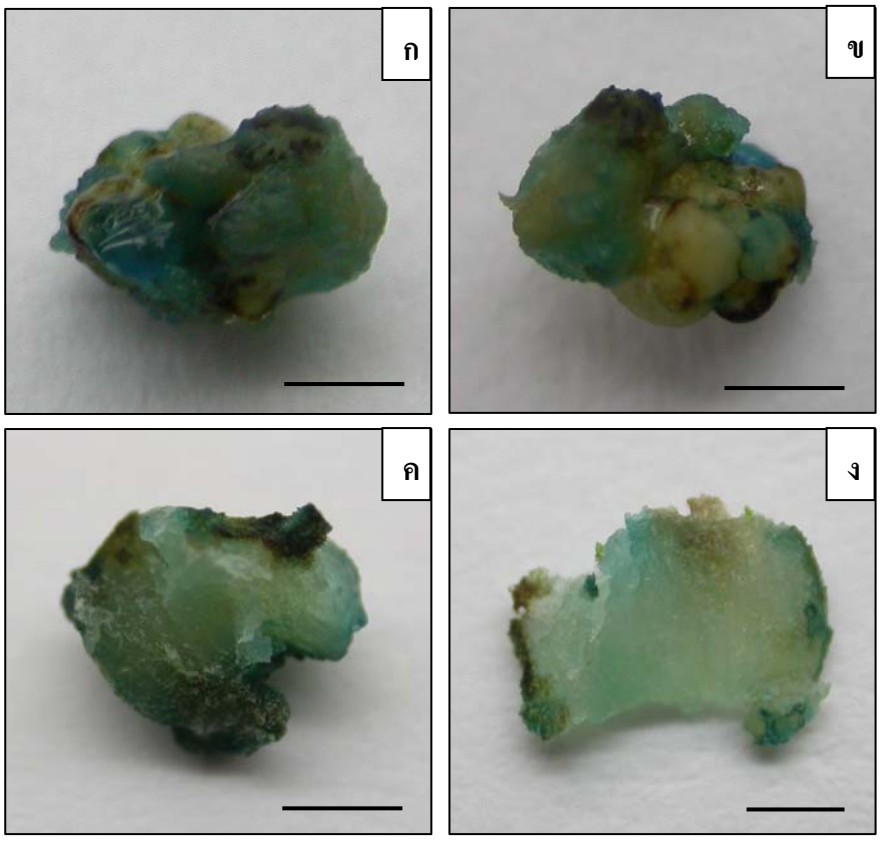
ค จุ่มแช่เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

ง จุ่มแช่เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

จ จุ่มแช่เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ฉ จุ่มแช่เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

หลังจากวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบาความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ จึงสุ่มโซมาติกเอ็มบริโอมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* (ภาพที่ 15 ก ข) และเมื่อนำโซมาติกเอ็มบริโอมาการตัดตามขวาง เพื่อต้องการตรวจสอบว่าเนื้อเยื่อภายในซึ่งอาจเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของโซมาติกเอ็มบริโอรุ่นต่อไปมีการติดสีน้ำเงินหรือไม่ พบว่าเนื้อเยื่อภายในของโซมาติกเอ็มบริโอมีการติดสีน้ำเงินเช่นกัน (ภาพที่ 15 ค ง)



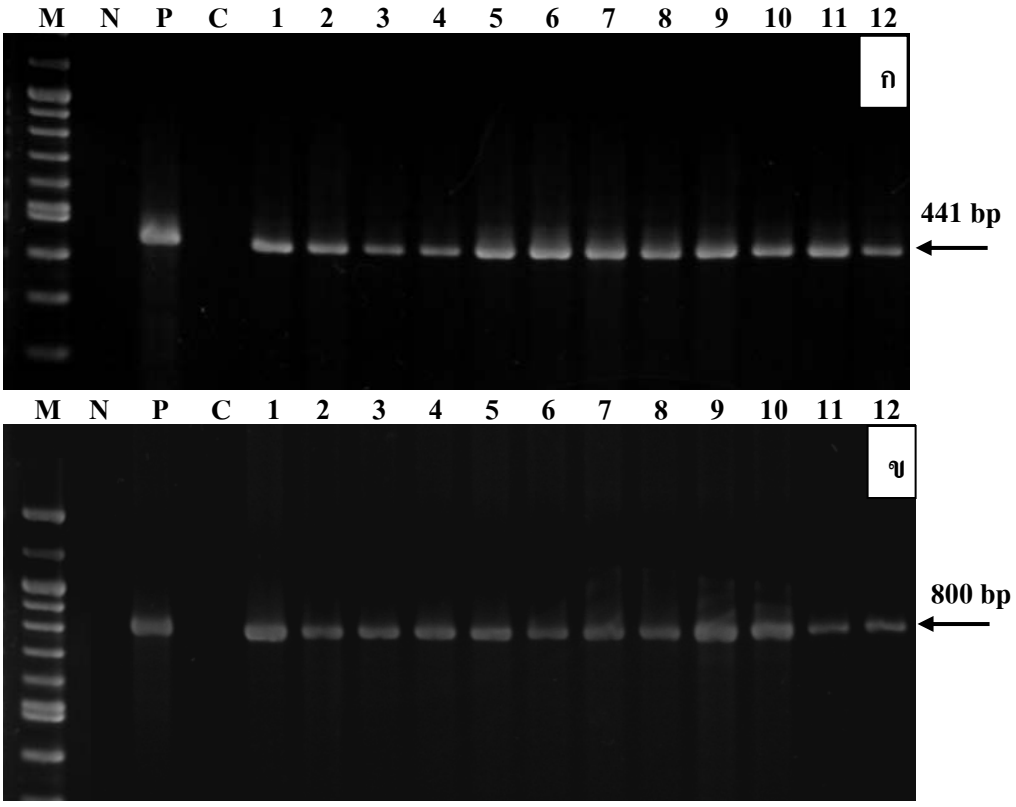
ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีน *gus* ของโซมาติกเอ็มบริโอ หลังการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม สายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 หลังวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 2 มิลลิเมตร)

ก - ข โซมาติกเอ็มบริโอที่สมบูรณ์

ค - ง โซมาติกเอ็มบริโอตัดตามขวาง

4. การตรวจสอบยีน *gus* และ *hpt* โดยเทคนิค PCR

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่รอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มาสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *hpt* คือF-primer 5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3' และ R-primer 5'-AAGACCAATGCGG AGCATATA-3' ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ส่วน ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *gus* คือ F-primer 5'-CTGCGACGCTCACACCGATAC-3' และ R-primer 5'-TCACCGAAGTTCA TGCCAGTCCAG-3' ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 441 คู่เบส พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* และ *hpt* ในตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 12 ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* (ก) และ *hpt* (ข) โดยเทคนิค PCR (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (N) negative control (P) positive control (C) ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยีน (1-12) ตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 ที่ค่า OD_{600} = 0.8 จุ่มแช่เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน

บทที่ 4

วิจารณ์

ผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนในพืชนั้นมีปัจจัยและวิธีการที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิด อายุชิ้นส่วน ความหนาแน่นของเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่และระยะเวลาการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เมื่อมีปัจจัยและวิธีการที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนในการคัดเลือกและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นก็สำคัญ โดยการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนั้น มีการใช้สารปฏิชีวนะในขั้นตอนของการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมหลังการส่งถ่ายยีน และการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งนี้การใช้สารปฏิชีวนะดังกล่าวอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชบางชนิดได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะที่เลือกใช้ต่อพืชที่ศึกษา

สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมเป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ และสามารถกำจัดแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาในพืชบางชนิด สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีม เป็นสารในกลุ่มเดียวกับ คาร์เบนิซิลลิน และ เพนิซิลลิน เป็นสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะไปยับยั้งการจับของพันธะ peptidoglycan และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ transpeptidase ซึ่งมีหน้าที่ในการเชื่อมรอยขาดของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิด osmotic shock และสุดท้ายเซลล์ก็จะแตก คณานาง (2550) รายงานว่า สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมสามารถยับยั้งการการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้ดีกว่า สารปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน และสารปฏิชีวนะมีโลเพน ดังนั้นพืชแต่ละชนิดที่ศึกษาการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ต้องมีการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อที่เหมาะสมต่อความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ จากการทดลองนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของซีโฟทาซีมที่ความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตและการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Pipatpanukul และคณะ (2004) ที่ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารปฏิชีวนะระหว่างซีโฟทาซีม และคาร์เบนิซิลลินในการกำจัดเชื้อส่วนเกิน ต่อการพัฒนาของแคลลัสข้าวซึ่งพบว่า ซีโฟทาซีม และคาร์เบนิซิลลินที่มีผลยับยั้งการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสได้สูงสุดคือ ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรในการกำจัดเชื้อส่วนเกินออกจากแคลลัส

ข้าว อินดิกาพันธุ์ RD6 นอกจากนี้ สุภาวดี (2548) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมออกจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) หลังการถ่ายยีนคือ ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวมีผลกระทบต่อความมีชีวิตรอดของโปรโตคอร์มน้อยที่สุด ในขณะเดียวกันระดับความเข้มข้นนี้สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้

ในขั้นตอนการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนนั้น การเลือกใช้ชนิดของสารปฏิชีวนะในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นขึ้นอยู่กับยีนคัดเลือกในส่วนของ T-DNA ว่าใช้ยีนตัวใดเป็นยีนคัดเลือก เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีนในการศึกษาครั้งนี้ ในส่วนของ T-DNA มียีน *hpt* เป็นยีนที่ใช้ในการคัดเลือก ซึ่งจะแสดงออกในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารเคมีที่ช่วยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์โปรตีนโดยเข้าไปเกาะกับ binding site ของ elongation factor2 (EF2) ยับยั้ง peptide chain elongation ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเจริญและพัฒนาได้ ในขณะที่พืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนที่มียีน *hpt* จะสามารถเจริญพัฒนาได้ตามปกติ เนื่องจากยีนดังกล่าวมีรหัสสำหรับสร้างเอ็นไซม์ hygromycin phosphotransferase ซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (สุมนทิพย์, 2540; อ้างโดย กัลยา, 2550) ซึ่งกระบวนการในการคัดเลือกและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่นับว่ามีความสำคัญ จากการศึกษานี้ พบว่าไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระดับที่เหมาะสมในการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้รับการถ่ายยีน เช่นเดียวกับการศึกษาของ สุภาวดี (2548) พบว่า สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นต่ำสุดซึ่งทำให้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ดตายทั้งหมดภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในกรณีของข้าว Khanna และ Raina (1999) Rachmawati และคณะ (2004) Hoque และคณะ (2005) Kumar และคณะ (2005) และ ลาวัลย์ (2543) รายงานว่า อาหารเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งทำให้แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญและพัฒนาได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ ความแตกต่างของความเข้มข้นอาจเนื่องมาจากชนิดพืชที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเซลล์ในแต่ละระยะที่นำมาทดสอบ หากเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการสังเคราะห์โปรตีนสูง ต้องใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสูงในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จึงจะทำให้เซลล์ไม่สามารถพัฒนาได้ ในกรณี

ของแคลลัสปาล์มน้ำมันมีระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณช้า ช่วงการสังเคราะห์โปรตีนต่ำจึงตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะดังกล่าวในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า

สำหรับแหล่งที่มาของชิ้นส่วนที่ต่างกันให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่างกัน จากการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบระหว่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากต้นโตจากแหล่งปลูกสองแหล่ง คือ สวนเกษตรกรจังหวัดกระบี่ (โคลนกระบี่) และสถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา (โคลนเทพา) ซึ่งพบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนกระบี่ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (*gus* และ *hpt*) ได้สูงกว่า ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากแหล่งปลูกของต้นแม่ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน จากการศึกษาของ Zhao และคณะ (2000) พบว่าการใช้เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ของข้าวฟ่างจากต้นที่โตในสภาพแปลงปลูก และในสภาพโรงเรือนอนุบาลซึ่งตั้งอยู่ในสถานที่ต่างกัน ส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยการใช้ชิ้นส่วนจากต้นในสภาพแปลงปลูกให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าต้นจากโรงเรือนอนุบาล และการศึกษาถ่ายยีนในข้าวฟ่าง โดยเปรียบเทียบแหล่งที่มาของชิ้นส่วน โดยใช้เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่จากต้นที่โตในสภาพที่ไม่ค่อยเหมาะสม เช่น มีสภาวะเครียดน้ำ อุณหภูมิต่ำ พบว่าชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาและตาย หลังจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ในขณะที่การใช้เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่จากต้นที่โตในสภาพที่เหมาะสม ชิ้นส่วนมีการพัฒนาหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และให้ขนาดของจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *gus* มากกว่า (Carvalho *et al*., 2004) สำหรับการศึกษานี้พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนเทพามีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอหลังวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นระยะเวลา 4 เดือน ซึ่งมีโอกาสพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงกว่าโคลนกระบี่ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนเทพามีระยะการย้ายเลี้ยงที่ยาวนานกว่าโคลนกระบี่ อัตราการเพิ่มปริมาณแคลลัสตลอดจนกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงกว่าจึงส่งผลให้มีการพัฒนาได้ดีกว่าโคลนกระบี่ เช่นเดียวกับการศึกษาของ ธนวดี (2551) ซึ่งพบว่า การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองของเอ็มบริโอระยะสร้างจาวในโคลนเทพาสูงกว่าโคลนกระบี่ จากการศึกษานี้จึงเลือกใช้แคลลัสโคลนเทพาเพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมในขั้นตอนต่อไป

เชื้ออะโกรแบคทีเรียมในสภาพธรรมชาติเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคปุ่มปมในพืช ทั้งนี้เนื่องจากสามารถส่งรหัสพันธุกรรมเข้าสู่พืชอาศัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว อย่างไรก็ตามความสามารถในการส่งถ่ายยีนมีความจำเพาะเจาะจงระหว่างชนิดพืชและสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมโดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งมีความยากกว่าใบเลี้ยงคู่ ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งไม่ได้เป็นพืชอาศัยโดยธรรมชาติของอะโกรแบคทีเรียม การเลือกใช้สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชสายพันธุ์นั้นๆ ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้

จากการศึกษานี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายเชื้อ AGL-1 และสายเชื้อ EHA105 ซึ่งทั้งสองสายเชื้อมีพลาสมิด pCAMBIA1301 pCAMBIA1302 และ pCAMBIA1304 พบว่า สายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 ให้อัตราการแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด เมื่อพิจารณาในส่วนของชนิดพลาสมิด พบว่า แม้ว่าพลาสมิดชนิดเดียวกันแต่อยู่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมต่างสายเชื้อกันก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนแตกต่างกัน ในกรณีของพลาสมิด pCAMBIA1301 ที่อยู่ในอะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA105 ให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนได้สูงกว่าสายเชื้อ AGL-1 และให้ผลในทำนองเดียวกันกับกรณีของพลาสมิด pCAMBIA1302 และ pCAMBIA1304 ซึ่งให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในสายเชื้อ AGL-1 สูงกว่าสายเชื้อ EHA105 ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความจำเพาะเจาะจง ระหว่างสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ชนิดพลาสมิด และสายพันธุ์ของพืชที่ศึกษา ทั้งนี้ในพืชต่างชนิดกัน สายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนก็จะต่างกัน สายเชื้อที่ใช้ในศึกษาการถ่ายยีนในพืชจำพวกธัญพืช ได้แก่สายเชื้อ EHA101 EHA105 AGL-1 และ LBA4404 (Orczyk *et al*., 2000) เช่น สายเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงในข้าวโพดและข้าวฟ่างคือ สายเชื้อ LBA4404 (Frame *et al*., 2002 อ้างโดย Cheng *et al*., 2004) ในขณะที่สายเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอจินิคแคลลัสของอ้อยคือ สายเชื้อ EHA105 (Zhangsun *et al*., 2007) เนื่องจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียมแต่ละสายเชื้อมีลักษณะต่างกัน เช่น สายเชื้อ AGL-1 ถือเป็น supervirulent host ซึ่งพัฒนามาจากสายพันธุ์ C58 เจริญเติบโตง่ายในห้องเพาะเลี้ยงซึ่งมีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (Lazo *et al*., 1991 อ้างโดย Chabaud *et al*., 2003) จึงอาจเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อความสามารถในการส่งถ่ายยีนได้สูงกว่าสายเชื้ออื่น ในการศึกษานี้ นอกจากสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมแล้วชนิดพลาสมิดก็มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Fuad และคณะ (2008) ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ของปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ LBA4404 เปรียบเทียบชนิดของพลาสมิด 2 ชนิดคือ pAF2 (binary vector) และ pAF3 (super binary vector) โดยใช้พลาสมิด pMR505 เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* แตกต่างกันในแต่ละพลาสมิด ซึ่งพลาสมิด pMR505 ให้การแสดงออกสูงสุด 80.9-93.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพลาสมิด pAF3 ให้การแสดงออก 70.5-96.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พลาสมิด pAF2 ให้การแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 52.6-85.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า super binary vector ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้ดีกว่าการใช้ binary vector อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พลาสมิดทั้งหมดที่ใช้เป็นแบบ binary vector ในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรทดลองใช้ super binary vector ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันต่อไป เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนให้สูงขึ้น

อายุของชิ้นส่วนพืชที่ต่างกันอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน จากการศึกษาอายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ดีที่สุด ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังย้ายเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน และ การพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันนั้น มีการสร้างสารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์พืช ดังนั้นการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นระยะเวลานานขึ้น มีการเพิ่มปริมาณสารดังกล่าวมากขึ้น หากไม่ย้ายเลี้ยงจะมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลออกมา ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ (Te-chato, 1998) จึงอาจเป็นไปได้ว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์มีการสร้างสารประกอบฟีนอลอยู่ในระดับที่เหมาะสม และเมื่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุมากขึ้นมีการสร้างสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่มากเกินไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง สอดคล้องกับการศึกษาในการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมร่วมกับแคลลัสข้าวสายพันธุ์ Moulata (Hoque *et al*., 2005) ชิ้นส่วนใบจากต้นกล้าโสมอินเดีย (Pandey *et al*., 2010) ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของกะหล่ำดอก (Chakrabarty *et al*., 2002) ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงจากต้นกล้าของถั่วเขียว (Tazeen and Mirza, 2004) ซึ่งพบว่า อายุของชิ้นส่วนมากขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลง อย่างไรก็ตามสารประกอบพวกฟีนอลนั้นมีความจำเป็นในการส่งถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมซึ่งไปมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ในการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด พบว่าการเติมอะซิโตไซริงกอนในระหว่างการบ่มชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนได้ Saharan และคณะ (2004) ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวโดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารอะซิโตซริงกอนที่ 100-500 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด ในขณะที่ Jabeen และคณะ (2009) ศึกษาการถ่ายยีนในมะเขือเทศ ทดสอบระดับความเข้มข้นของสารอะซิโตไซริงกอนที่ระดับ 0-100 ไมโครโมลาร์ พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด ในกรณีของปาล์มน้ำมันในการศึกษานี้ใช้สารอะซิโตไซริงกอนเพียงความเข้มข้นเดียวคือ 200 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการส่งถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการศึกษาต่อไปควรมีการทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารอะซิโตไซริงกอนที่เหมาะสม เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการสร้างสารประกอบฟีนอลอยู่แล้ว เมื่อมีการเติมสารอะซิโตไซริงกอนมากหรือน้อยเกินไปมีผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำลงได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชแต่ละชนิดมีช่วงระยะเวลาการเจริญและพัฒนาแตกต่างกันแต่โดยรวมแล้วจะให้ผลในทำนองเดียวกันในหลาย ๆ พืช คือ การใช้ชิ้นส่วนที่อ่อนหรือแก่เกินไปส่งผลต่อประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนลดลง ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากระยะพัฒนาการของเซลล์และสภาพทางสรีรวิทยาของ

ชิ้นส่วนพืช เมื่อมีการบุกรุกโดยอะโกรแบคทีเรียมก็จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ และการสร้างฮอร์โมนซึ่งมีผลต่อกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (Braun, 1954; Binns, 1990 อ้างโดย Moyal Ben Zvi *et al*., 2008) ตลอดจนการสร้างสารชีวเคมีของชิ้นส่วนในแต่ละระยะอาจส่งผลต่อการถ่ายยีนได้ เช่นการศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้ พบว่า โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการทำบาดแผลโดยการตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อใช้ในการถ่ายยีนจะมีการหลั่งสารบางอย่างออกมาจากบาดแผลส่งผลยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย อย่างไร ก็ตาม สารดังกล่าวนั้นยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ แต่เป็นสารที่พืชใช้ป้องกันการทำลายจากเชื้อโรค (Kushikawa *et al*., 2001 อ้างโดย พิสิฐ, 2546)

ปริมาณเชื้อที่จะนำมาใช้ในการส่งถ่ายยีนจำเป็นต้องมีการศึกษาให้เหมาะสมกับชนิดของชิ้นส่วนพืช ปริมาณเชื้อที่มากเกินอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชได้ ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ใช้ในขั้นตอนการส่งถ่ายยีนแตกต่างกัน เมื่อสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ชนิดพืช แตกต่างกัน ซึ่งการปรับความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมก่อนนำมาเลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนพืชนั้น นิยมปรับความหนาแน่นของเชื้อด้วย การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ที่ระดับต่าง ๆ จากการทดลองนี้ ได้ปรับค่า OD_{600} เท่ากับ 0.4 -1.0 พบว่า ที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด สอดคล้องกับ Gu และคณะ (2008) ศึกษาการถ่ายยีนในพุทราจีน โดยปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD_{600} ตั้งแต่ 0.2 -1.2 พบว่า ที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุด การใช้เชื้อที่ความหนาแน่นน้อยหรือมากกว่า 0.8 ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง Yang และคณะ (2008) ถ่ายยีนใน *Acacia crassicarpa* พบว่า การปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน 42 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลในทำนองเดียวกันกับในกรณีศึกษาการถ่ายยีนในอ้อยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 พบว่าการปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD_{660} เท่ากับ 0.4 และ 0.8 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุด (Joyce *et al*., 2010) และในกรณีของถั่วเขียวศึกษาความหนาแน่นของเชื้อโดยการปรับค่า OD_{560} ระหว่าง 0.8 – 1.5 พบว่าที่ค่า OD_{560} เท่ากับ 1.0 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดและจะลดลงเมื่อค่า OD ต่ำหรือสูงกว่า 1.0 (Tazeen and Mirza, 2004) ในขณะที่ การปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน 44.7 เปอร์เซ็นต์ในมะเขือเทศ (Gao *et al*., 2009) จากหลาย ๆ รายงานดังกล่าวนั้นพบว่าการใช้ปริมาณเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้การกำจัดเชื้อให้หมดไปจากชิ้นส่วนพืชได้ยาก ส่งผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ ทำให้อัตราการถ่ายยีนต่ำ อย่างไรก็ตามหากปริมาณเชื้อน้อยเกินไปก็อาจทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำด้วยเช่นกัน

สำหรับระยะเวลาในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมนั้น ถือเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันจากการศึกษา พบว่าการจุ่มแช่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด ซึ่งเมื่อจุ่มแช่เป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ ปิยะฉัตร และคณะ (2549) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะเข้าสู่กล้วยไม้ *Phalaenopsis* พบว่า การใช้ อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ EHA 105 ปลูกเชื้อนาน 6 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าเลี้ยงโดยไม่ต้องตัดแบ่งโปรโตคอร์มให้ผลการปลูกถ่ายยีนดีที่สุด ในพืชบางชนิดใช้เวลาในการจุ่มแช่สั้นกว่าเช่น Ding และคณะ (2007) พบว่าการจุ่มแช่ เอ็มบริโอที่สุกแก่ของข้าวสาลีเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดและเมื่อจุ่มแช่นานขึ้นเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง การศึกษาการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมในพืชหลาย ๆ ชนิดนั้น ส่วนใหญ่แล้วจะใช้เวลาจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมระยะสั้นประมาณ 5 - 30 นาที ดังการรายงานของ Pandey และคณะ (2010) ศึกษาระยะเวลาจุ่มแช่ใบของโสมอินเดียโดยเปรียบเทียบระยะเวลาการจุ่มแช่ในช่วง 5 -30 นาที พบว่าการจุ่มแช่เป็นระยะเวลา 15 นาทีให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด และในกรณีของข้าวหลายๆ พันธุ์ เช่น พันธุ์ WP และ PB1 (Arockiasamy and Ignacimuth, 2007) พันธุ์ BRRI dhan-29 BRRI dhan-33 และ Binnnatoa (Nazim-Ud-Dowla *et al*., 2008) ให้ผลทำนองเดียวกัน คือ การจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารละลายเชื้อ เป็นเวลา 10-15 นาทีให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดถึงแม้จะใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมต่างสายเชื้อกัน แม้กระทั่งในกรณีของปาล์มน้ำมัน Abdulah และคณะ (2005) ใช้ระยะเวลาการจุ่มแช่ เอ็มบริโอที่ยังไม่สุกแก่ในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 30 นาทีสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ถึง 64.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า การจุ่มแช่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 30 นาที ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของพันธุ์ อายุ และชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้แตกต่างกัน ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนที่ต่างกันได้ แสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิด แต่ละชิ้นส่วน จะมีระยะเวลาที่เหมาะสมในการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารละลายเชื้อต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลที่สร้างโดยเซลล์พืชต่างกันส่งผลต่อระยะเวลาในการส่งถ่ายยีน แต่จะเป็นไปในทำนองเดียวกันคือ การแสดงออกของยีน *gus* จะเพิ่มขึ้นเมื่อจุ่มแช่นานขึ้นและจะสูงสุดที่ระยะเวลาหนึ่ง หากจุ่มแช่ต่อไปเป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของยีน *gus* ลดลง

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม พบว่าถ้าเลี้ยงร่วมกันเป็นระยะเวลานานจะทำให้มีการเพิ่มปริมาณของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในปริมาณ

มากทำให้กำจัดให้หมดจากชิ้นส่วนได้ยาก ซึ่งอาจส่งผลต่อพัฒนาการของชิ้นส่วนพืชได้ ซึ่งจากการศึกษานี้เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคร่วมกับเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น ส่งผลให้การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอลดลง ซึ่งระยะเวลาเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมคือ 3 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Tazeen and Mirza (2004) ศึกษาการถ่ายยีนในถั่วเขียวพบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นระยะเวลา 3 วัน ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด และเช่นเดียวกับข้าว พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วันให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด และเมื่อเลี้ยงร่วมเป็นเวลานานขึ้นมีแนวโน้มการแสดงออกของยีน *gus* ลดลง (Hoque *et al*., 2005) แต่ในกรณีบลูเบอรี่ พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นระยะเวลา 6 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด (Song and Sink, 2004) และในโสมอินเดีย พบว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นระยะเวลา 5 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด และลดลงเมื่อเลี้ยงร่วมนานขึ้น (Pandey *et al*., 2010)

ดั้งนั้นจึงเห็นได้ว่า ทุกปัจจัยที่ศึกษาไม่ว่าจะเป็น อายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ระยะเวลาการจุ่มแช่ชิ้นส่วน รวมทั้งระยะเวลาการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมจะให้ผลที่ดีที่สุดในระดับหนึ่ง หากให้ปัจจัยดังกล่าวในระดับที่น้อยหรือมากเกินกว่าระดับที่เหมาะสมแล้ว ก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง

ส่วนการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *gus* และ *hpt* โดยเทคนิค PCR พบว่ามีการคงอยู่ของยีนดังกล่าว ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสองในตัวอย่างทั้งหมดที่สุ่มมาตรวจสอบ ซึ่งในการตรวจวิเคราะห์ผลจะต้องตรวจสอบตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนควบคู่กันไปด้วยเสมอ เพื่อให้แน่ใจว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นมาจากยีนที่ใส่เข้าไปในพืช ไม่ได้เป็นดีเอ็นเอจากพืชนั้น ๆ ซึ่งจากการตรวจสอบตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสอง จึงแน่ใจได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเกิดจากการได้รับยีนดังกล่าวเข้าไป ทั้งนี้จะต้องมีการติดตามและตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในระหว่างกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป เพื่อที่จะสามารถยืนยันได้ว่า สามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่มียีนดังกล่าวสอดแทรกอยู่ในจีโนมได้สำเร็จ

บทที่ 5

สรุป

สารปฏิชีวนะซีโฟทาซีมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้อส่วนเกิน ออกจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหลังการส่งถ่ายยีน และสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้รับการส่งถ่ายยีนจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ปาล์มน้ำมันโคลนกระบี่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้สูงกว่าโคลนเทพาโดยให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซินพบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโคลนเทพาสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอซึ่งมีความสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงกว่า

อะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 ซึ่งประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA1304 ให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันได้สูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 87.77 เปอร์เซ็นต์ และให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันรอดชีวิต 28.67 เปอร์เซ็นต์

การใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันอายุ 4 สัปดาห์ หลังการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำมาเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 82.08 เปอร์เซ็นต์ และให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรอดชีวิต 36.88 เปอร์เซ็นต์ การใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุมากขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลง

การปรับความหนาแน่นของสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.8 ก่อนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็งเติมอะซิโตไซริงกอนความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 3 วัน ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* 100 เปอร์เซ็นต์ และให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรอดชีวิต 63.89 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ 4 เอ็มบริโอต่อหลอดทดลอง

การตรวจสอบการปลูกถ่ายยีน *gus* และ *hpt* โดยเทคนิค PCR โดยสกัดดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่รอดชีวิตหลังการถ่ายยีน 8 สัปดาห์ จากการจุ่มแช่ในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายเชื้อ AGL-1 pCAMBIA1304 ที่ค่า OD_{600} = 0.8 จุ่มแช่ชิ้นส่วนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน จำนวน 12 ตัวอย่างพบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 441 คู่เบส ของยีน *gus* และขนาด 800 คู่เบสของยีน *hpt* ใน ตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบ

เอกสารอ้างอิง

กวิยา พร้อมมูล. 2549. มารู้จักพืชตัดต่อสารพันธุกรรมกันเถอะ. *ใน* การทำปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. หน้า 160. สงขลา: บริษัทแม็กซ์ มีเดีย วาย 2 เคเพรส จำกัด.

กัลยา รัตนถาวรกิติ. 2550. การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กาญจนา แซ่เอี๊ยบ. 2551. การปลูกถ่ายยีนในกล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูรโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เกศณี มณีกาศ. 2546. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยการใช้ mini-binary vector. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คนานาง จันทนวรรณ. 2550. ผลของความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนต่างๆ และการปลูกถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์โซเนต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. เอกสารคำสอนวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุษบา ล้อประเสริฐ. 2548. คู่มือการปลูกปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร.

ปิยะฉัตร เชยชุ่ม รักชนก โคโต และเสริมสิริ จันทร์เปรม. 2549. การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะเข้าสู่กล้วยไม้สกุลฟาเลนนอฟซีส. การประชุมพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2550. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช. *ใน* เอกสารโครงการฝึกอบรมหลักสูตรการถ่ายยีนเข้าสู่พืช. หน้า 27-36. นครปฐม: ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

พิสิฐ ชัยประเดิมศักดิ์. 2546. การศึกษาวิธีการถ่ายยีน Chalcone reductase (*chr*) และ Dihydroflavonol-4-reductase (*dfr*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยอะโกรแบคทีเรียม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์นุกูล. 2543. การถ่ายฝากยีน Chymotrypsin Inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าวขาวดอกมะลิ105โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2551. ปาล์มน้ำมันกับการพัฒนาเป็นพลังงานทดแทน. [Online] Available: http://www.zyworld.com/NAKARIN/earthwatch17.htm#rosa11. (เข้าถึงเมื่อ 3/12/2551).

สุภาวดี ถาวโร. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด (*Cymbidium findlaysonianum* Lindl). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdullah, R., Zainal, A., Heng, W. Y., Li, L. C., Beng, Y. C., Phing, L. M., Sirajuddin, S. A., Ping, W. Y. S., Joseph, J. L., Jusoh, S. A., Muad, M. R. and Huey, Y. L. 2005. Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. Plant Biotechnology 8: 24-34.

Ali, S., Xianyin, Z., Xue, Q., Hassan, M. J. and Qian, H. 2007. Investigations for improved genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in two rice cultivars. Biotechnology 6: 138-147.

Arockiasamy, S. and Ignacimuthu, S. 2007. Regeneration of transgenic plant from two indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using shoot apex explants. Plant Cell Reports 26: 1745-1753.

CAMBIA, 2006. pCAMBIA vector. [online] Available: http://www.cambia.org. (accessed on 7/11/2009).

Cardoza, V. and Stewart, C. N. 2003. Increased Agrobacterium-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Reports 21:599–604.

Carvalho,C. H. S., Zehr, U. B., Gunaratna, N., Anderson, J., Kononowicz, H. H., Hodges, T. K. and Axtell, J. D. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. Genetics and Molecular Biology 27: 1415-4757.

Chabaud, M., Carvalho-Niebel, F.de., Barker, D.G. 2003. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv.Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. Plant Cell Reports 22: 46- 51.

Chakrabarty, R., Viswakarma, N., Bhat, S. R., Kirti, P. B., Singh, B. D. and Chopra, V. L. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. Journal of Biosciences 27: 495-502.

Cheng, M., Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, M. and Armstrong, C. L. 2004. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro* Cell. and Developmental Biologia Plantalum 40: 31-45.

Chia, T. F., Chan, Y. S. and Chua, N. H. 1994. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. Plant Journal 6: 441–446.

Chowdhury, M. K. U., Ghulam Kadir, A. P. and Norihan, M. S. 1997. Evaluation of five promoters for use in transformation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Cell Reports 16: 277-281.

Darlington, D. E., Hung, C. Y., Xie, J. 2009. Developing an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation for a selenium-hyperaccumulator in *Astragalus racemosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 99: 157-165.

Degefu, Y. and Hanif, M. 2003. *Agrobacterium-tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. Archives of Microbiology 180: 279-284.

Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G. and He, G. 2009. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. Molecular Biology Reports 36: 29-36.

Fuad, F. A. A., Ismail, I., Sidik, N. M., Zain, C. R. C. M. and Abdullah, R. 2008. Super binary vector system enhanced transformation frequency and expression level of polyhydroxyvalerate gene in oil palm immature embryo. Asian Journal of Plant Sciences 7: 526-535.

Gao, N., Shen, W. Cao, Y., Su, Y. and Shi, W. 2009. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 98: 321-330.

Gu, X. F., Meng, H., Qi, G. and Zhang, J.R. 2008. *Agrobacterium*- mediated transformation of the winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 94: 23-32.

Hiei, Y. and Komari, T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. Nature Protocols 3: 824-834.

Hiei, Y. and Komari, T. 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85: 271-283.

Hoque, Md. E., Mansfield, J. W. and Bennett, M. H. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficiency. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 45-55.

Jabeen, N., Mirza, B., Chaudhary, Z.., Rashid, H. and Gulfraz, M. 2009. Study of the factors affecting *Agrobacterium*-mediated gene transformation in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) cv. Riogrande using rice chitinase (*Cht-3*) gene. Pakistan Journal of Botany 41: 2605-2614.

Jefferon, R. A., Kananagh, T. A. and Bevan, M.W. 1987. GUS fusion: ß-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. EMBO Journal 6: 3301-3306.

Joyce, P., Kuwahata, M., Turner, N. and Lakshmanan, P. 2010. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. Plant Cell Reports 29: 173-183.

Karami, O., Esna-Ashari, M., Karimi Kurdistani, K. and Aghavaisi, B. 2009. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. Biologia Plantalum 53: 201-212.

Kenel, F., Eady, C. and Brinch, S. 2010. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. Plant Cell Reports 29: 223-230.

Khanna, H. K. and Raina, S. K. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice cultivars using binary and super binary vectors. Australian Journal Plant Physiology 26: 311-324.

Knapp, J. E., Kausch, A. P. and Chandlee, J. M. 2000. Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. Plant Cell Reports 19: 893-898.

Krugel, T., Lim, M., Gase, K., Halitschke, R. and Baldwin, I. T. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Nicotiana attenuata*, a model ecological expression system. Chemoecology 12:177–183.

Kumar, K. K., Maruthasalam, S., Loganathan, M., Sudhakar, D. and Balasubramanian, P. 2005. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. Plant Molecular Biology Reporter 23: 67–73.

Lee, M. P., Yeun, L. H. and Abdullah, R. 2006. Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic oil palm. Plant Biotechnology 9: 117-126.

Li, S. H., Kuoh, C. S., Chen, Y. H., Chen, H. H. and Chen, W. H. 2005. Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 183-192.

Manickavasagam, M., Ganapathi, A., Anbazhagan,V. R., Sudhakar, B., Selvaraj, N., Vasudevan, A. and Kasthurirengan, S. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistan sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. Plant Cell Reports 23: 134-143.

Masli, D. I. A., Kadir, A. P. G. and Yunus, A. M. M. 2008. Transgenic oil palm mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Malaysian Palm Oil Board 401: 426-429.

Men, S., Ming, X., Wang, Y., Liu, R., Wei, C. and Li, Y. 2003. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. Plant Cell Reports 21: 592-598.

Mishiba, K., Chin, D. P. and Mii, M. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. Plant Cell Reports 24: 297-303.

Moyal Ben Zvi, M., Zuker, A., Ovadis, M., Shklarman., Ben-Meir, H., Zenvirt, S. and Vainstein, A. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.). Molecular Breeding 22: 543-553.

Nazim-Ud-Dowla, M. A. N., Ahmed, N. U. and Hassan, L. 2008. Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in indica rice. Thai Journal of Agricultural Science 41: 127-133.

Nguyen, T. V., Thanh Thu, T., Claeys, M., Angenon, G. 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using an improved in vitro regeneration system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 155-164.

Ogaki, M., Furuichi, Y., Kuroda, K., Chin, D. P., Ogawa, Y. and Mii, M. 2008. Importance of co-cultivation medium pH for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium x formolongi*. Plant Cell Reports 27:699-705.

Orczyk, A. N., Orczyk, W. and Przetakiewicz, A. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals-from technique development to its application. Acta Physiologia Plantarum 22: 77-88.

Pandey, V., Misra, P., Chaturvedi, P., Misra, M.K., Trivedi, P.K. and Tull, R. 2010. *Agrobacterium tumefacien*s-mediated transformation of *Withania somnifera* (L.) Dunal: an important medicinal plant. Plant Cell Reports 29: 133-141.

Parveez, G. K. A., Chowdhury, M. K. U. and Saleh, N. M. 1998. Biological parameters affecting transient GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryogenic calli via microprojectile bombardment. Industrial Crops and Products 8: 17-27.

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

Rachmawati, D., Hosaka, T., Inoue, E. and Anzai, H. 2004. *Agrobacterium*- mediated transformation of javanica rice cv. Rojolele. Bioscience Biotechnology Biochemistry 68: 1193-1200.

Rao, M. V. R. and Rao, G. J. N. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice under acetosyringone-free conditions. Plant Biotechnology 24: 507-511.

Romero, J. P., Houlne, G., Canas, L., Schantz, R. and Chamarro, J. 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 173–180.

Saharan, V., Yadav, R. C., Yadav, N. R. and Ram, K. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology 3: 572-575.

Sharwat, A.K., Becker, D. and Lorz, H. 2006. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) Plant Science 172: 281-290.

Stanton, B. G. 2003. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. Biotechnology 21: 95-98.

Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P., and Duncan, D. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. Plant Cell Reports 25: 320–328.

Song, G. Q. and Sink, K. C. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Plant Cell Reports 23: 475-484.

Tazeen, S. and Mirza, B. 2004. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Pakistan Journal of Botany 36: 887-896.

Te-chato, S. 1998. Callus induction from cultured zygotic embryo of oil palm subsequent to plantlet regeneration. Songklanakarin Journal of Science and Technology 20: 1-6.

Te-chato, S. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) makers for genetic analysis in somaclones of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai Journal of Agricultural Science 33: 137-145.

Toki, S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Molecular Biology Reporter 15: 16-21.

Tzfira, T. and Citovsky, V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Biotechnology 17: 147-154.

Wu, Y. Y., Chen, Q. J., Chen, M., Chen, J. and Wang, X. C. 2005. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene. Plant Science 169: 65-73.

Yan, B., Srinivasa Reddy, M. S., Collins, G. B. and Dinkins, R. D. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Reports 19: 1090-1097.

Yang, J., Lee, H. J., Shin, D. H., Oh, S. K., Seon, J. K., Paek, K. Y. and Han,K. H. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. Plant Cell Reports 18: 978-984.

Yang, M., Xie, X., Zheng, C., Zhang, F., He, X. and Li, Z. 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Acacia crassicarpa* via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 95: 141-147.

Yu. Z., Chen. M., Nie. L., Lu. H., Ming. X., Zheng. H., Qu. L. J. and Chan. Z. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 87-92.

Zhangsun, D., Luo, S., Chen, R. and Tang, K. 2007. Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *gnc* transgenic sugarcane. Biologia Bratislava 4: 386-393.

Zhao, Z. Y., Cai, T., Tagliani, L., Miller, M., Wang, N., Pang, H., Rudert, M., Schroeder, S., Hondred, D., Seltzer, J. and Pierce, D. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. Plant Molecular Biology 44: 789–798.

Zhao, F. Y., Li, Y. F. and Xu, P. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. *Zhongmian35*) using glyphosate as a selectable marker. Biotechnology Letters 28: 1199-1207.

Zhao, S. Z., Ruan, Y., Sun, H. Z. and Wang, B. S. 2008. Highly effcient *Agrobacterium*-based transformation system for callus cells of the C_3 halophyte *Suaeda salsa*. Acta Physiologia Plantarum 30: 729–736.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ตารางองค์ประกอบของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
$MnSO_4 1H_2O$	16.90
$ZnSO_4 7H_2O$	10.60
$CuSO_4 5H_2O$	0.025
$NaMoO_4 2H_2O$	0.25
$CoCl_2 6H_2O$	0.025
$CaCl_2 2H_2O$	440.00
$MgSO_4 7H_2O$	370.00
$FeSO_4 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
PyridoxineHCl(B6)	0.50
ThiamineHCl(B1)	0.10
Glycine	2.00
Sucrose 3%, Agar 0.6-0.7% (0.75%), pH 5.7-5.8	

ภาคผนวกที่ 2 ตารางองค์ประกอบของสูตรอาหาร Luria and Bertani broth (LB)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (ก./ล.)
Bacto tryptone	10
Bacto yeast extract	5
NaCl	10
Bacto agar	15
pH	7

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ปริมาตรตามต้องการปิดปากด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการทำให้อาหารแข็งให้เติม Bacto agar ลงไปในส่วนผสม 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเทอาหารใส่จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร จานละ 20 มิลลิลิตร

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR

1. ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ของยีน *gus* (1X/20µl)

สารประกอบของปฏิกิริยา	สารละลายเข้มข้น	ปริมาตรที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR buffer	10X	2 µl	1X
$MgCl_2$	50 mM	0.8 µl	2 mM
dNTP mix	1 mM	4.0 µl	200 µM
Primer GUS-F	50 µM	0.1 µl	0.25 µM
Primer GUS-RV	50 µM	0.1 µl	0.25 µM
Taq polymerase	2 U/µl	0.5 µl	1 U
DNA template		1 µl	
dH_2O		11.5 µl	

2. ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ของยีน *hpt* (1X/20µl)

สารประกอบของปฏิกิริยา	สารละลายเข้มข้น	ปริมาตรที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR buffer	10X	2 µl	1X
$MgCl_2$	50 mM	0.8 µl	2 mM
dNTP mix	1 mM	4.0 µl	200 µM
Primer *hpt*-F	50 µM	0.1 µl	0.25 µM
Primer *hpt*-RV	50 µM	0.1 µl	0.25 µM
Taq polymerase	2 U/µl	0.5 µl	1 U
DNA template		1 µl	
dH_2O		11.5 µl	

3. การทำปฏิกิริยา PCR

นำส่วนผสมต่างๆใส่เครื่อง PCR โดยกำหนดเวลา และอุณหภูมิ ดังนี้

	gus				*hpt*			
	96°C	2	นาที	30 รอบ	96°C	2	นาที	30 รอบ
Denaturing	96°C	20	วินาที		96°C	20	วินาที	
Annealing	55°C	1	นาที	↓	55°C	1	นาที	↓
Extension	72°C	2	นาที		72°C	2	นาที	
	72°C	5	นาที		72°C	5	นาที	

ภาคผนวกที่ 4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาแน่นเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วม ต่อการแสดงออกของยีน *gus* ภายหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	2	1164.6832	582.3416	2.39^{ns}	0.0969
D	3	18975.2219	6325.0740	25.99**	0.0001
I	3	16207.0817	5402.3606	22.20**	0.0001
D x I	9	13364.0750	1484.8972	6.10**	0.0001
C	2	10996.1510	5498.0755	22.60**	0.0001
D x C	6	1804.6333	300.7722	1.24^{ns}	0.2950
I x C	6	791.2205	131.8701	0.54^{ns}	0.7750
D x I x C	18	6022.1440	334.5636	1.37^{ns}	0.1626

C.V. (%) = 34.71

D = ความหนาแน่นเชื้อ I = ระยะเวลาจุ่มแช่ C = ระยะเวลาเลี้ยงร่วม

^{ns} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาแน่นเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	2	22717.0834	11358.5417	25.90^{ns}	0.0001
D	3	9392.0795	3130.6932	7.14**	0.0002
I	3	10569.7292	3523.2431	8.03**	0.0001
D x I	9	6196.7663	688.5296	1.57^{ns}	0.1356
C	2	5428.4815	2714.2407	6.19**	0.0030
D x C	6	968.4275	161.4046	0.37^{ns}	0.8975
I x C	6	1562.6111	260.4352	0.59^{ns}	0.7345
D x I x C	18	6007.3750	333.7431	0.76^{ns}	0.7390

C.V. (%) = 24.62

D = ความหนาแน่นเชื้อ I = ระยะเวลาจุ่มแช่ C = ระยะเวลาเลี้ยงร่วม

^{ns} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาแน่นเชื้อ ระยะเวลาการจุ่มแช่ และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อจำนวนการสร้าง SE ต่อหลอดภายหลังการถ่ายยีนเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	2	3.7066514	1.8533257	1.41^{ns}	0.2491
D	3	24.9003167	8.3001056	6.32**	0.0006
I	3	30.4100389	10.1366796	7.72**	0.0001
D x I	9	21.2658889	2.3628765	1.80	0.0786
C	2	13.0453556	6.5226778	4.96**	0.0089
D x C	6	6.6864667	1.1144111	0.85^{ns}	0.5361
I x C	6	6.7225778	1.1204296	0.85^{ns}	0.5327
D x I x C	18	19.5317778	1.0850988	0.83^{ns}	0.6659

C.V. (%) = 32.78

D = ความหนาแน่นเชื้อ I = ระยะเวลาจุ่มแช่ C = ระยะเวลาเลี้ยงร่วม

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

ภาคผนวกที่ 7 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ของ Te-chato (2000)

1. TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)	500	ไมโครลิตร
0.1M EDTA (pH 8.0)	200	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. SDS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

SDS	5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

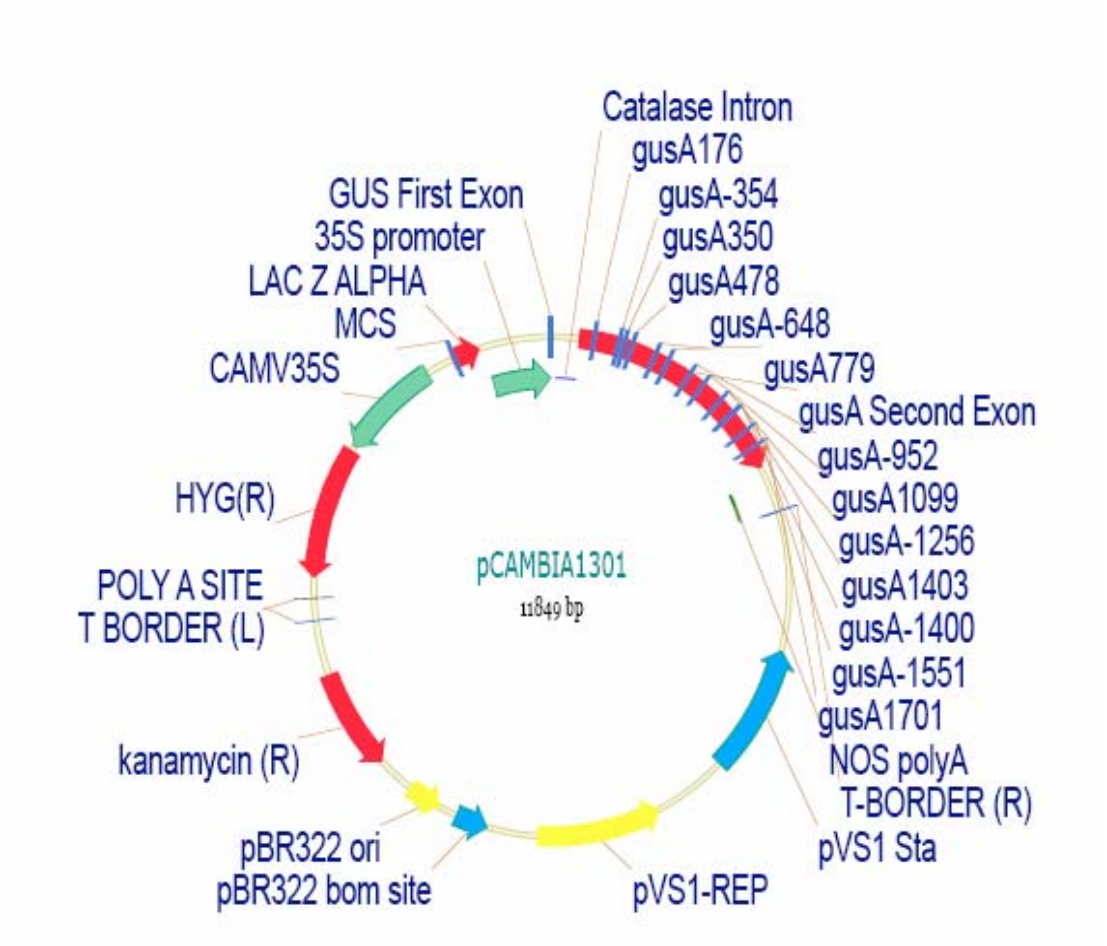
3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

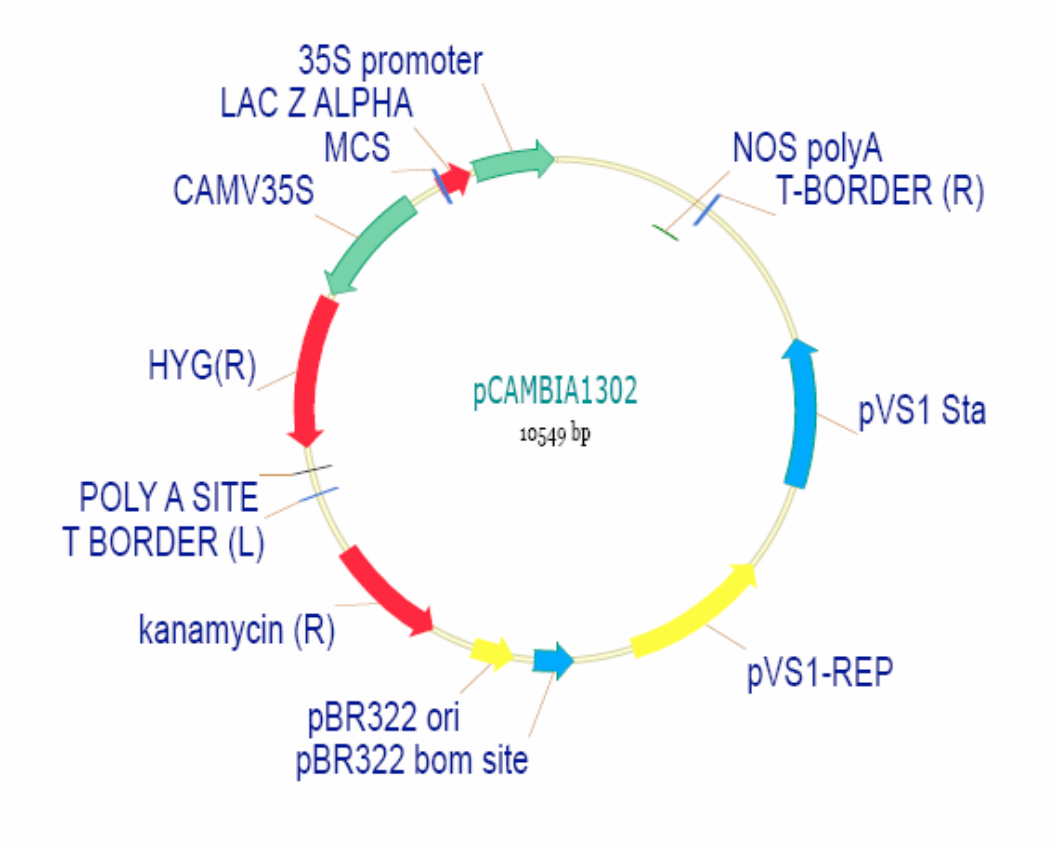
4. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร



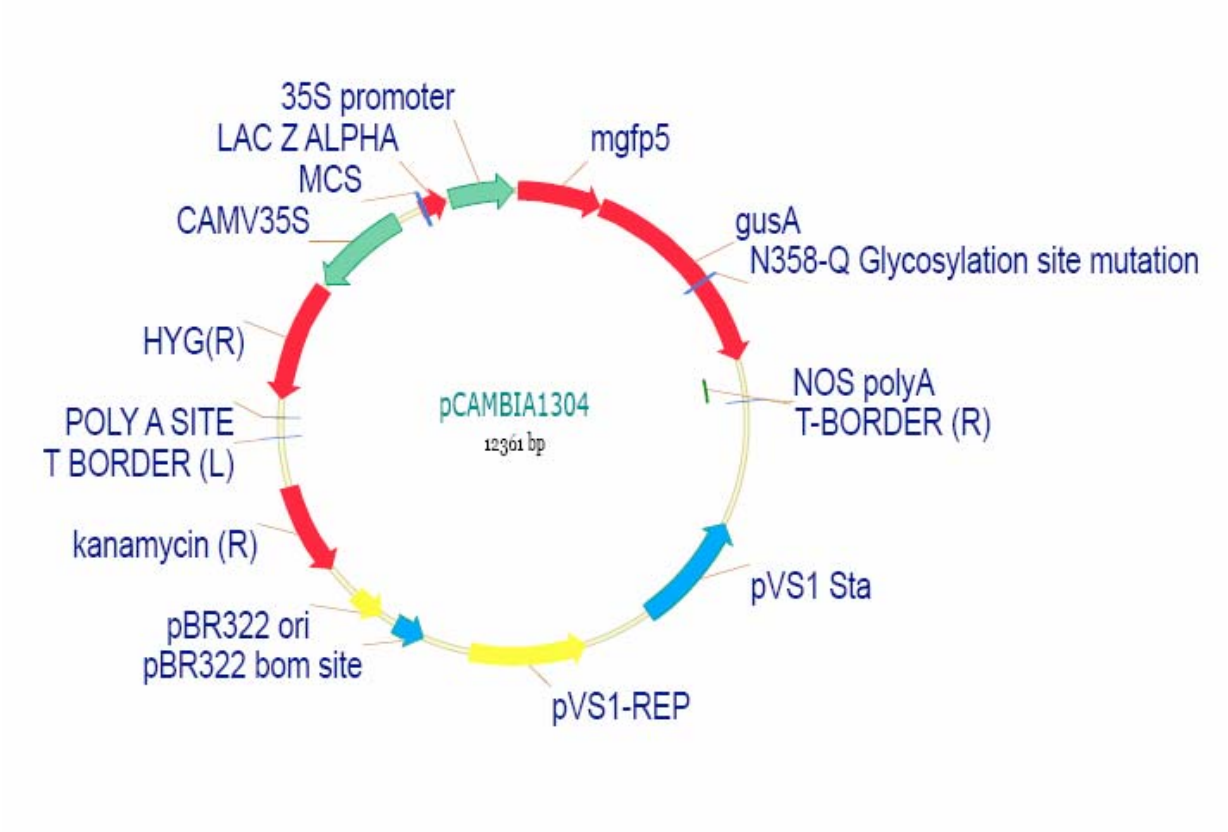
ภาคผนวกที่ 8 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301

ที่มา: CAMBIA (2006)



ภาคผนวกที่ 9 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1302

ที่มา: CAMBIA (2006)



ภาคผนวกที่ 10 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1304

ที่มา: CAMBIA (2006)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุรีรัตน์ เย็นช้อน

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620070

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์ สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

สุรีรัตน์ เย็นช้อน และ สมปอง เตชะโต. 2552. ผลของแหล่งชิ้นส่วนต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40(3) (พิเศษ): 444-447.

สุรีรัตน์ เย็นช้อน และ สมปอง เตชะโต. 2553. ผลของชนิดสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและอายุของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์).