รายงานการวิจัย

การพัฒนาระบบการปลูกถ่ายยีนร่วมกับต้นอ่อนปาล์มน้ำมันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Development of Gene Transformation with Somatic Embryos of Oil Palm Derived from Tissue Culture)

โดย

สมปอง เตชะโต

สุรีรัตน์ เย็นช้อน

ยุพาภรณ์ ศิริโสม

สุนทรียา กาละวงศ์

ภาควิชาพืชศาสตร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงผลของปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพต่อการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมและเครื่องยิงอนุภาค พบว่า ความเข้มข้นของซีโฟทาซึมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และส่งเสริมการเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้คือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนคือที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สายเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายยีนคือ สายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ยีน *hpt*II เป็นยีนคัดเลือก และการใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์จุ่มแช่สารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD600 เป็น 0.8 อินคูเบทนาน 6 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ในกรณีการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงยีน พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันอายุ 4 สัปดาห์บนอาหารออสโมติคัมเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันสุญญากาศ -0.1 เมกะปาศคาล แรงดันก๊าซฮีเลียม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนและเป้าหมาย 10 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* และแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินสูงสุด เมื่อนำมาตรวจสอบการสดงออกของยีน *gus* และ *hpt* II โดยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) พบว่ามีการปรากฏของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และ *hpt* II ขนาด 800 คู่เบส

Abstract

Physical and biological factors affecting gene transformation by *Agrobacterium*-mediated or particle bombardment were investigated. The results showed that concentration of cefotaxime at 200 mg/l was suitable for inhibition overgrowth of *Agrobacterium*. Hygromycin at 30 mg/l inhibited growth of the callus completely so it was a suitable for selection transformed embryogenic callus. *Agrobacterium* strain AGL-1 containing plasmid pCAMBIA1304 which carrying the *gus* and *hpt* as screenable and selectable marker genes, respectively, gave the best transformation efficiency. The age of embryogenic callus (EC) at 4 weeks after subculture inoculated in *Agrobacterium* solution at density of 0.8 (OD600) for 6 hours gave the highest transient expression of *gus* gene. In case of gene transformation by particle bombardment, optimal conditions for gene transformation in EC (4 weeks after subculture to fresh medium) were pre-cultured on osmoticum medium for 16 hours before bombardment. Bombardment was carried out at a reduced air pressure of -0.1 MPa, helium pressur of 5 kg/cm2 and working distance (distance from microcarrier to target tissue) of 10 cm. Those conditions gave the highest *gus* expression and percentage of hygromycin resistant calli. Polymerase chain reaction (PCR) analyses of transgenic tissue confirmed the presence of *gus* gene at size of 441bps and *htp* at size of 800 bps