ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

Factors Affecting Gene Transformation in Embryogenic Callus of Oil Palm by Bombardment

สุนทรียา กาละวงศ์

Soontreeya Kalawong

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 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

ผู้เขียน นางสาวสุนทรียา กาละวงศ์

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

…….

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

ผู้เขียน นางสาวสุนทรียา กาละวงศ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ยิงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยอนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ประกอบด้วยยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก พบว่า ปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คือ แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 10 เซนติเมตร และแรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 65.74% 62.33% และ 66.22% ตามลำดับ สำหรับปัจจัยทางเคมีนั้น พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารออสโมติคัมก่อน และหลังการยิงยีนส่งผลต่อประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน แมนนิทอลร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.3 โมลาร์ ที่เติมลงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมสารออสโมติคัม เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน ให้การแสดงออกของยีน *gus* 68.75% หลังการยิงยีน นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารเติมน้ำตาลชนิดเดิม ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน 38.63% เมื่อตรวจสอบเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกเป็นเวลา 1 เดือน ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่า มียีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส อยู่ภายในจีโนมของปาล์มน้ำมันที่ได้รับการถ่ายยีน

Thesis Title	Factors Affecting Gene Transformation in Embryogenic Callus of Oil Palm by Bombardment
Author	Miss Soontreeeya Kalawong
Major Program	Plant Science
Academic Year	2010

Abstract

The study on chemical and physical factors affecting gene transformation in embryogenic callus (EC) of oil palm was conducted using bombardment technique. EC was bombarded with gold particles (1.0 µm of particle size) coated with plasmid pCAMBIA 1301 (1.5 µg/ µl) which harboring *gus* and *hpt* gene used as screenable and selectable marker genes, respectively. The results revealed that an optimal conditions of physical factors for gene transformation in EC were bombardment at 5 kg/cm^2, 10 cm working distance and -0.1 MPa vacuum pressure. Those factors gave the highest transient expression of *gus* gene at 65.74%, 62.33% and 66.22%, respectively. The effect of chemical factors affecting to gene transformation in EC revealed that pre-cultured EC on MS medium supplemented with 0.3 M mannital and 0.3 M sorbitol under dark condition for 16 h gave transient expression of *gus* gene at 68.75%. Post-cultured bombarded EC on the same medium and condition for 24 h gave the highest transient expression of *gus* gene at 38.63%. These expressions were stable until one month of culture. Polymerase chain reaction (PCR) revealed *gus* gene at 441 bp and *hpt* gene at 800 bp in genome of transformant plants.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	17
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	18
วัสดุ อุปกรณ์	18
วิธีการ	23
3 ผล	30
4 วิจารณ์	52
5 สรุป	59
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	69
ประวัติผู้เขียน	77

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของระดับแรงดับก๊าซฮีเลี่ยมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	31
2	ผลของระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	35
3	ผลของแรงดันสูญญากาศต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	38
4	ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีนต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	40
5	ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีนต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	43
6	ผลของชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	47
7	ผลของชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	47
8	ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัม ก่อนการคัดเลือกต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์	50

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	18
2	การแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค histochemical method ในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการยิงยีนที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ระดับต่าง ๆ หลังการถ่ายยีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	32
3	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการยิงยีนที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ระดับต่าง ๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	33
4	การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
5	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการยิงยีนที่ระยะห่างต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	36
6	การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	37
7	การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระดับแรงดันสูญญากาศที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	39

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีนที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	41
9	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	44
10	การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีนที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	45
11	การตรวจสอบยีน *gus* (ก) และ *hpt* (ข) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	48
12	การตรวจสอบยีน *gus* (ก) และ *hpt* (ข) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน ที่ผ่านการยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยการใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัม ก่อนการคัดเลือกที่ระยะเวลาแตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	51

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

MS	=	Murashige and Skoog medium
dicamba	=	3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid
EC	=	Embryogenic callus
CRD	=	Completely ramdomized design
DMRT	=	Duncan multiple range test
GUS	=	ß-glucuronidase
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
dNTP	=	Deoxy nucleotide triphosphate
TE	=	Tris-EDTA
psi	=	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
kg/cm^2	=	กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
inHg	=	นิ้วปรอท
MPa	=	เมกะปาศคาล
M	=	โมลาร์
%	=	เปอร์เซ็นต์
มก/ล	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชยืนต้น และใบเลี้ยงเดี่ยว ที่มีการเพาะปลูกได้เฉพาะในพื้นที่เขตร้อนชื้นของโลกที่อยู่ระหว่างเส้นละติจูด 10 องศาเหนือ-ใต้ มีประเทศที่เพาะปลูกพืชนี้ จำนวน 42 ประเทศ จากจำนวนทั้งหม ดทั่วโลก 223 ประเทศ (ธีระ และคณะ, 2548) การขยายตัวของพื้นที่ปลูกปาล์มที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 30 ปีที่ผ่านมา โดยในปี 2549 มีเนื้อที่เก็บเกี่ยวผลทะลายปาล์มสดทั่วโลกทั้งหมด 78.8 ล้านไร่ ประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย มีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 22.62 และ 22.5 ล้านไร่ ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยมีการเพาะปลูกปาล์มน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศดังกล่าว คือ มีพื้นที่เก็บเกี่ยวผลผลิต 2.02 ล้านไร่ (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี , 2549) โดยรัฐบาลได้ประกาศขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 10 ล้านไร่ ภายในเวลา 25 ปี (พ.ศ. 2547-2572) (ธีระ และคณะ , 2548) นอกจากนี้ยังกำหนดยุทธศาสตร์พลังงานทดแทนโดยใช้น้ำมันปาล์ม เป็นวาระแห่งชาติ ซึ่งรัฐบาลโดยกระทรวงพลังงานมีเป้าหมายให้ใช้ไบโอดีเซล 3 เปอร์เซ็นต์ ของการใช้น้ำมันทั้งหมดในปี พ.ศ. 2554 (พรชัย, 2549) แนวโน้มในอนาคตคาดว่า ควา มต้องการในการผลิตปาล์มน้ำมันในประเทศจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการใช้ต้นพันธุ์ที่ดีนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง วัตถุประสงค์ทั่วไปในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน คือ เพิ่มผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่ การปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดี ให้ต้นเตี้ย (การเพิ่มความสูงของต้นช้า) ความยาวทางใบไม่สั้นหรือยาวเกินไป ลำต้นอวบสมบูรณ์ มีความต้านทานต่อโรค และแมลง เช่น โรคบราวน์เยิม โรคใบไหม้ โรคยอดเน่า โรคต้นเน่า ด้วงแรด ด้วงกุหลาบ และหนอนห่อใบ และสามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำมัน เช่น ลดปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว เพิ่มปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว เพิ่มแคโรทีน และวิตามินอี เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ปาล์มน้ำมันนั้นเป็นพืชยืนต้น การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการดั้งเดิม คือ การผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อ และแม่ที่คัดเลือกไว้ แล้วทำการทดสอบลูกผสม (progeny test) ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 7-8 ปี โอกาสได้พันธุ์ใหม่มีความไม่แน่นอนสูง และ หากถ้าพ่อแม่มีความแตกต่างสายพันธุ์มาก โอกาสจะสำเร็จมีน้อย (Rajanaidu and Jalani, 1995 อ้างโดย Chowdhury *et al.,* 1997) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พืชใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการ ในกรณีของปาล์มน้ำมัน วิธี

ที่นิยมใช้ และให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง คือ การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม และเครื่องยิงอนุภาค แต่การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมมีข้อจำกัด คือ ให้ผลดีเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากในธรรมชาติเชื้อชนิดนี้ไม่เข้าทำลายในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ทำได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ใช้ได้กับทุกส่วนของต้นพืช ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ และมีการแสดงออกของยีนที่ถ่ายฝากได้อย่างถาวรในต้นพืชนั้น (ลาวัลย์, 2543) ความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม (Parveez *et al.,* 1997; Kikkent, 1993) ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย (Tee and Maziah*.,* 2005) แรงดันสูญญากาศ (Guirimand *et al.,* 2009) ชนิด และขนาดของอนุภาคโลหะ (Parveez *et al.,* 1998) และจำนวนครั้งในการยิง (Purkayastha *et al.,* 2010) ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ และสปอร์มิดีนที่ใช้ร่วมกับ ดีเอ็นเอเพื่อเคลือบอนุภาคทอง (Mousavi *et al.,* 2009) ระยะเวลาการใช้สารออสโมติคัมก่อน และหลังการถ่ายยีน (Vain *et al.,* 1993) ชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัม (Perl *et al.,* 1992) และปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ (Visarada and Sarma, 2004) และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่ใช้ในการเคลือบอนุภาค (Sreeramanan *et al.,* 2005) เป็นต้น

แม้ว่ามีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันแต่ยังมีข้อจำกัดหลายประการ และคุณภาพที่ได้ค่อนข้างน้อย ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญในการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมัน คือ ปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันมาก ดังนั้นในการศึกษานี้เป็นการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมีที่เหมาะสมในการถ่ายยีนอย่างมีประสิทธิภาพเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการถ่ายยีนในอนาคตต่อไป

ตรวจเอกสาร

ปาล์มน้ำมัน จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในตระกูล Palmae หรือ Arecaceae เช่นเดียวกับ มะพร้าว จาก อินทผลัม และตาลโตนด มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา เริ่มนำเข้าสู่ประเทศไทยโดยพระยาประดิพัทธ์ภูบาล เป็นผู้นำเข้ามาเป็นครั้งแรกประมาณ 60 ปีมาแล้ว (ธีระ และคณะ, 2548) พืชนี้เป็นพืชยืนต้นผสมข้ามประเภทที่มีช่อดอกตัวผู้ และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่ละช่วงเวลาการออกดอกจะไม่พร้อมกัน เป็นพืชดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2X = 32$ จัดอยู่ในสกุล *Elaeis* แบ่งได้ 3 ชนิดคือ *Elaeis guineensis* *E. oleifera* และ *E. odora* ชนิดที่ปลูกในปัจจุบัน ได้แก่ *E. guineensis* มี 3 พันธุ์ คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยอาศัยความแตกต่าง

ของลักษณะความหนาของกะลา (shell) การปรากฏของเส้นใยสีน้ำตาลบริเวณเนื้อผลชั้นนอกปาล์ม (mesocarp) รอบ ๆ กะลา และความหนาเนื้อผลชั้นนอก ลักษณะแตกต่างดังกล่าว เฉพาะความหนาของกะลา และการปรากฏของเส้ นใยสีน้ำตาล พบว่า ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงคู่เดียว โดยลักษณะปาล์มน้ำมันแบบดูราควบคุมแบบยีนเด่น 1 คู่ (Sh^+Sh^+) คือ มีกะลาที่หนา ลักษณะปาล์มแบบเทเนอร่าถูกควบคุมด้วยยีนพันทาง 1 คู่ (Sh^+sh^-) คือ มีกะลาแต่ไม่หนา และมีเส้นใยสีน้ำตาลรอบกะลา และลักษณะผลปาล์มแบบ พิสิเฟอรา ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ (sh^-sh^-) คือ กะลาบาง และมีเส้นใยสีน้ำตาลรอบกะลา ซึ่งแบบนี้ไม่นิยมปลูกเป็นทางการค้า เนื่องจากช่อดอกตัวเมียมีโอกาสเป็นหมันสูง ผลมีขนาดเล็ก และผลิตต่ำ ส่วนพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า คือ พันธุ์เทเนอร่ า ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูรากับพิสิเฟอรา เป็นพันธุ์ที่มีเปลือกผลสำหรับอัดน้ำมันมาก ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีกะลาบาง (0.5-4 มิลลิเมตร) มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 22-25 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทะลายสด มีทะลายดกกว่าพันธุ์ดูรา (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ , 2541) การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ปกติสามารถทำได้โดยวิธี การใช้เมล็ดพันธุ์ เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ไม่มีการแตกหน่อ หรือกิ่งแขนง จึงไม่สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศโดยทั่วไป เช่น การปักชำ ตอนกิ่ง และติดตา ดังนั้นการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีไม่อาศัยเพศที่สามารถทำได้ คือ การขยายพันธุ์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ 1) การชักนำให้เกิดแคลลัสเริ่มแรกจากชิ้นส่วนพืช 2) การชักนำให้เกิดแคลลัสเจริญเร็วจากแคลลัสเริ่มแรก 3) การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิซีส และ 4) การชักนำได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ (Lioret, 1981) กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาจาก 2 กระบวนการ คือ ออร์กา โนเจนิซีส และเอ็มบริโอเจนิซี ส ซึ่งทั้งสองกระบวนการนี้ พืชต้นใหม่ที่ได้อาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง หรือเกิดขึ้นโดยผ่านการสร้างแคลลัส ต่างกันตรงที่กระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีสให้พืชต้นใหม่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอจากการผสมพันธุ์ ส่วนกระบวนการออร์กาโนเจนิซีสมีการสร้างยอด หรือราก หรือทั้งยอด และรากพร้อมกัน แต่ไม่มีการเชื่อมต่อกันของท่อน้ำ และท่ออาหารระหว่างยอด และราก (นิจวรรณ , 2545) เรียกเอ็มบริโอที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกายว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) หรือเอ็มบริออยด์ (embryoid) โซมาติกเอ็มบริโอดังกล่าวมีระยะการพัฒนาแบ่งได้ 4 ระยะ คือ รูปกลม รูปหัวใจ ระยะทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) Hussey (1958) รายงานการพักตัว

ของเมล็ดปาล์มน้ำมันเนื่องจากปัจจัยในเนื้อผล (kernel factor) ดังนั้นการเพาะเมล็ดต้องผ่านกระบวนการ stratification Rabechault และ Cas (1974) ตัดแยกคัพภะออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเติมออกซิน พบว่า สามารถส่งเสริมการงอกได้ Cui (1985) รายงานการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะในอาหารเติมออกซินชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงคัพภะต้องอาศัยวิธีการเตรียมคัพภะที่เหมาะสม ก่อนที่นำมาเพาะเลี้ยง เจริญ (2532) ตัดแยกคัพภะ ออกจากเมล็ด ปาล์มน้ำมัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า สามารถชักนำ ให้เกิด การงอกของคัพภะได้ 98.5 เปอร์เซ็นต์ Kanchanapoom และ Damyaos (1999) ตัดแยกคัพภะปาล์มน้ำมันมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y_3 (Eeuwens) เติม 2,4-D (2,4-dichorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนพัฒนาให้แคลลัสได้ภายใน 8 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำได้ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบ นอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ชักนำเอ็มบริออยด์ได้ นอกจากนี้อายุของคัพภะที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่แตกต่างกันด้วย คัพภะอายุ 193 วัน หลังการผสมให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ (Teixeira *et al.*, 1993) Teixeira และคณะ (1995) ทำการทดลองโดยใช้เอ็มบริโอที่ยังอ่อน และสุกแก่ของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่ามาชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า การใช้เอ็มบริโอที่ยังอ่อนสามารถชักนำเริ่มแรก ได้ในอาหารสูตร Y_3 เติม 2,4-D เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้เอ็มบริโอที่ สุกแก่สามารถชักนำ friable embryogenic tissue (FET) ได้ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 475 ไมโครโมลาร์ หรือ picloram เข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับผงถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ Te-chato (1998a) ผลิตต้นกล้าปาล์มน้ำมันจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงคัพภะปาล์มน้ำมันที่เก็บเกี่ยวจากต้นแม่เทเนอร่าผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส พบว่า ต้นที่ได้ไม่มีความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานแต่อย่างใด เมื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซม พบว่า เหมือนต้นเดิม คือ 2n=2x=32

Rajesh และคณะ (2003) ใช้ polyamine ในการส่งเสริมพัฒนาการของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ putrescine เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ โซมาติกเอ็มบริโอชุดที่สอง (secondary somatic embryo, SSE) การงอก การสร้างยอด และการสร้างรากสูงสุด โดยเฉลี่ย 0.70 5.60 2.97 5.50 1.27 และ 0.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Te-chato (1998b) และ Te-chato (2002) เปรียบเทียบการใช้ 2,4-D กับ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.1 และ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ พบว่า การใช้ dicamba ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงกว่า 2,4-D ถึง 5.15 เท่า อีกทั้งยังสามารถร่นระยะเวลาในการชักนำแคลลัสได้ อาสลัน (2545) เพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้

ผลผลิตดีบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และให้จำนวนปมต่อชิ้นส่วนสูงสุด 11.2 เปอร์เซ็นต์ และ 7.06 ปมต่อชิ้นส่วน ตาม ลำดับ Chehmalee และ Te-chato (2008) ทำการเพาะเลี้ยงไซโกติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำใช้เกิดแคลลัส 87.52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลดความเข้มข้นของ dicamba ลงเหลือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 26.03 เปอร์เซ็นต์ และโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้า งจาว 14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างจาวย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ร่วมกับกรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การพัฒนา SSE 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายกลุ่มของ SSE บนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้การงอกเป็นพืชต้นใหม่ 3.7 เปอร์เซ็นต์

เทคนิคพันธุวิศวกรรมและการถ่ายยีน

กระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่พืชเป็นการนำยีนที่ต้องการจากพืชหนึ่งเข้าสู่อีกพืชหนึ่ง เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ยอมรับยีนจากแหล่งอื่นเข้าไปสอดแทรกอยู่ในจีโนมจะก่อให้เกิดก ารเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุ กรรมของพืชนั้น ๆ และอาจแสดงลักษณะของยีนที่ถ่ายยีนออกมาได้ เมื่อนำเ ซลล์ดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่ แสดงลักษณะของยีนนั้นออกมาได้ เรียกพืชนั้ นว่าเป็น พืชดัดแปลงพันธุ์ (transgenic plant หรือ genetically engineered plant) นับจาก ค .ศ. 1970 ได้มีการแยกเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ ดีเอ็นเอ เอนไซม์ที่สามารถตัดโมเลกุลของ ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งจำเพาะ (restriction enzymes) และเอนไซม์ที่สามารถเชื่อมต่อเข้ากับส่วนของดีเอ็นเอ ทำให้สามารถตัดต่อยีน และย้ายยีนด้วยวิธีต่าง ๆ เข้าไปยังเซลล์ ความสำเร็จเหล่านี้ช่วยในการปรับปรุงพั นธุ์พืชที่มีวัตถุประสงค์หลาย ๆ ด้าน ซึ่งบางด้านได้รับความสำเร็จเป็นอย่างดี บางด้านยังอยู่ระหว่างการศึกษา เช่น การสร้าง พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรค และแมลง ทนต่อสภาวะแห้งแล้ง ผลิตสารเคมีใน อุตสาหกรรมอาหาร และยายืดอายุการเก็บรักษา ผลิตไม้ดอก ไม้ประดับ และพืชอาหารที่มีผลผลิต และคุณภาพตามที่ต้องการ เป็นต้น

ปัจจุบันการถ่ายยีนเข้าสู่พืชสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิด และเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน วิธีการถ่ายยีนสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีการใหญ่ ๆ คือ การถ่ายยีน โดยตรง ได้แก่ การถ่ายยีนด้วยวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า การถ่ายยีนด้วยวิธีการใช้เข็มฉีดขนาดเล็ก การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ด้วยการใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG) และการถ่ายยีนด้วยการใช้เครื่องยิง

อนุภาค เป็นต้น ส่วนการถ่ายยีนทางอ้อมด้วยการอาศัยพาหะ (vector-mediated gene transfer) นิยมใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะในการถ่ายยีน ซึ่งการย้ายยีนโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียม เป็นพาหะใช้ได้ดีกับเซลล์พืชใบเลี้ยงคู่ แต่เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวเกิดได้ยาก แต่ก็มีการทดลองใช้วิธีอื่น ๆ เช่น การผสมโปรโตพลาสต์กับสารละลายพลาสมิด แล้วกระตุ้นด้วยสารเคมี หรือกระแสไฟฟ้าเพื่อให้พลาสมิดเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ และการยิงอนุภาค ให้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด (Sanford *et al.,* 1993) สำหรับวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันนิยมปฏิบัติ คือ การถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง และไม่มีข้อจำกัดในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น particle bombardment, biolistic method, microprojectile bombardment และ electric discharge particle acceleration หรือ helium particle flow gun (Finer *et al.,* 1992) การถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค พัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย John Sanford ที่มหาวิทยาลัยคอร์เนลล์ ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ใช้ได้กับทุกส่วนของต้นพืช ทั้งพืชใบเลี้ยงคู่ และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และมีการแสดงออกของยีนที่ถ่ายได้อย่างถาวรในต้นพืชนั้น โดยอาศัยแรงขับดันจากการระเบิดของดินปืน พาให้อนุภาคขนาดเล็ก (1-4 ไมโครเมตร) ได้แก่ ทังสเตน หรือ ทอง ซึ่งเคลือบด้วยดีเอ็นเอ ที่ต้องการจากแหล่งอื่น ผ่านทะลุผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ โดยไม่ทำให้พืชได้รับอันตรายจากการยิง อนุภาคโลหะเหล่านี้จะพาดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์ ทำให้ ดีเอ็นเอ นั้นมีโอกาสสอดแทรกเข้าไปอยู่ในจีโนมพืช ต่อมามีการพัฒนาเครื่องยิงอนุภาคอีกหลายรูปแบบ โดยต่างกันที่แหล่งของแรงที่ใช้ขับเคลื่อนอนุภาคโลหะเป็นหลัก เครื่องต้นแบบของ Sanford และคณะ (1987) เครื่องแรกที่มีแรงขับเคลื่อนอนุภาคโลหะจากการระเบิดของกระสุนดินปืนขนาด 0.22 caliber ต่อมาพัฒนามาใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง โดย McCabe และ Christou (1993) ใช้แรงดันจากก๊าซไนโตรเจน (Morikawa *et al.,* 1989) ใช้แรงอัดอากาศ (Oard, 1993) และการใช้แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม (Takenchi *et al.,* 1992) เป็นต้น

ความสำเร็จในการถ่ายยีนด้วยวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ได้สภาพการยิงยีนที่เหมาะสมสำหรับการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเป้าหมาย และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ McCabe และ Chistou (1993) ได้แบ่งปัจจัยต่าง ๆ ออกเป็น 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางด้านเคมี และปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน

1. ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพ คือ ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน ได้แก่ แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย แรงดันสูญญากาศ ชนิดของอนุภาคโลหะ ขนาดของอนุภาคโลหะ และจำนวนครั้งในการยิง เป็นต้น โดยความสำเร็จในการถ่ายยีนด้วยการใช้เครื่องยิงอนุภาคนั้น ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน ซึ่งการใช้เนื้อเยื่อตัวอย่างที่แตกต่างกัน ระดับแรงดันก๊าซที่ความเหมาะสมที่ใช้ในการยิงก็แตกต่างกัน Barranco และคณะ (2009) ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 650 900 1,100 และ 1,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSD-1000/He, BioRad) ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของมะกอก พบว่า 900 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินสูงสุด โดยที่ระดับแรงดัน 1,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินต่ำสุด Tee และ Maziah (2005) ศึกษาระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 ระดับ คือ 450 650 900 1,100 และ 1,550 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSD-1000/He, BioRad) ยิงอนุภาคที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอเข้าสู่แคลลัสที่แตกต่างกันสองลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Sonia 17) คือ แคลลัสชนิด A มีลักษณะสีเหลืองซีดประกอบด้วยแคลลัสที่เกาะกันแน่น และแคลลัสที่เกาะกันอย่างห ลวม ๆ ส่วนแคลลัสชนิด B มีลักษณะรูปกลมและมีสีเหลืองใส โดยลักษณะของแคลลัสนี้แบ่งตามรายงานของ Tee และคณะ (2003) พบว่า ในแคลลัสชนิด A เมื่อให้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้การแสดงออกของยีน *gus* และ *gfp* สูงสุด คือ 78 และ 107 จุดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แต่ในกรณีของแคลลัสชนิด B กลับพบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้การแสดงออกของยีน *gus* และ *gfp* สูงสุด คือ 96 และ 244 จุดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ Suwanaketchanatit และคณะ (2007) เปรียบเทียบระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 2 ระดับ คือ 6,200 กิโลปาสคาล (899.234 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) และ 7,500 กิโลปาสคาล (1,087 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วย ไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Jacquelyn Thomas) พบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซที่ 1,087 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนกว่าที่ระดับแรงดันก๊าซ 899.234 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว คือ มีจำนวนจุดสีน้ำเงิน 25.26 และ 26.34 ตามลำดับ และให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 48.89 และ 73.99 ตามลำดับ Chai และคณะ (2007) ศึกษาระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 3 ระดับ คือ 1,100 1,350 และ 1,550 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เข้าสู่แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวายที่เป็นลูกผสม 2 สายพันธุ์ (*Dendrobrium* Madame Thong-In และ *Dendrobrium* Chao Praya Smile) พบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 1,350 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว ให้การแสดงออกยีนสูงสุดในทั้งสองสายพันธุ์ คือ 14.0 และ 18.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ให้ผลใกล้เคียงกันกับการศึกษาของ Ingram และคณะ (1999) ศึกษาระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอที่มาจากไมโครสปอร์ของข้าวสาลี โดยใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 650 1,100 และ 1,300 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSD-1000/He, BioRad) พบว่าที่ระดับแรงดันก๊าซ 1,300 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด Mousavi และคณะ (2009) ศึกษาระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ อินทผาลัม โดยใช้ระดับแรงดันก๊าซแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 900 1,100 และ 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSD-1000/He, BioRad) พบว่า การใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุด คือ 512±39 จุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุด การศึกษาการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมัน Abdullah และคณะ (2005) ศึกษาระดับแรงดันก๊ าซฮีเลี่ยม 3 ระดับ คือ 900 1,100 และ 1,300 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSD-1000/He, BioRad) เข้าสู่ไซโกติกเอ็มบริโอ พบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 900 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดถึง 67.36 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Parveez และคณะ (1997) ศึกษาระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 9 ระดับ คือ 450 650 900 1,100 1,300 1,550 1,800 2,000 และ 2,200 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSD-1000/He, BioRad) ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แสดงผลการเกิดกิจกรรมของยีน *gus* สูงสุด โดยมีจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 1,029±166 จุดต่อชิ้นส่วน เมื่อเปรียบเทียบกับระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม การใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่แรงดันก๊ าซระดับต่ำสามารถส่งถ่ายยีนได้ Akashi และคณะ (2002) ศึกษาระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่แตกต่างกัน 5 ระดับ 2 2.5 3 4 และ 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ซัสเพนชั่น ของหญ้าดอลลีส (*Paspalum dilatatum*) พบว่า ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือ 71.115 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุด คือ 2,436 จุดต่อการยิง โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคนี้เป็นเครื่องที่ประดิษฐ์ขึ้นเอง ใช้หลักการในการถ่ายยีนเดียวกับเครื่องยิงอนุภาคของ Takenchi และคณะ (1992) และได้มีการใช้เครื่องยิงอนุภาคนี้ในการศึกษาของ Gondo และคณะ (2009) และ Himuro และคณะ (2009) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิค แคลลัส ของหญ้าโร้ดส์ (*Chloris gayana*) และหญ้าบาเฮีย (*Paspalum notatum*) ตามลำดับ ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 71.115 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด

ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย เป็นปัจจัยหลักตัวหนึ่งที่ มีผลต่อความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย โดยพืชแต่ละชนิด แต่ละชิ้นส่วน จะใช้ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต่างกัน Barranco และคณะ (2009) เปรียบเทียบระยะห่าง

ระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 2 ระดับ คือ ที่ระยะห่าง 6 และ 9 เซนติเมตร ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของมะกอก พบว่า ที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินสูงสุด Mousavi และคณะ (2009) ใช้ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ที่ระยะห่าง 6 9 และ 12 เซนติเมตร ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิค แคลลัสของอินทผาลัม พบว่า ที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงถึง 205±85 จุดต่อชิ้นส่วน Sreeramanan และคณะ (2005) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่หน่อ และ ส่วนของลำต้นที่ตัดมาของกล้วยที่เกิดจากการ ชักนำในหลอดทดลอง พบว่า ที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* และยีน *gfp* สูงสุด ในหน่อกล้วย แต่ในส่วนของลำต้นที่ตัดมานั้น พบว่า ที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* และยีน *gfp* สูงสุด Tee และ Maziah (2005) ที่ศึกษาระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 3 ระดับ คือ ที่ระยะห่าง 6 9 และ 12 เซนติเมตร ในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวาย 2 ชนิด ในแคลลัสชนิด A พบว่า ที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* และ *gfp* สูงสุด คือ 95 และ 78 จุดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แต่ในกรณีของแคลลัสชนิด B กลับพบว่า ที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* และ *gfp* สูงสุด คือ 108 และ 221 จุดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ Chai และคณะ (2007) ศึกษาการ ถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยการเปรียบเทียบ ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 2 ระดับ คือ ที่ระยะห่าง 6 และ 9 เซนติเมตร พบว่า ที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงถึง 14 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม พรสุข (2543) ศึกษาระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ (*Dendrobium sabi*) พบว่า ที่ระยะห่าง 10 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงสุด Akashi และคณะ (2002) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ซัสเพนชั่นของหญ้าดอลลีส (*P. dilatatum*) ใช้ระยะห่างที่แตกต่างกัน 3 ระดับ 6.2 9.6 และ 12.5 เซนติเมตร พบว่า ที่ระยะห่าง 12.5 เซนติเมตร ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุด คือ 2,436 จุดต่อการยิง อย่างไรก็ตาม Gondo และคณะ (2009) และ Himuro และคณะ (2009) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิค แคลลัส ของ หญ้าโร้ดส์ (*C. gayana*) และหญ้าบาเฮีย (*P. notatum*) ตามลำดับ ใช้ระยะห่าง 12.5 เซนติเมตร ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด ในการศึกษาการถ่ายยีนในปาล์มน้ำมัน Parveez และคณะ (1997) ศึกษาระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 ระดับ คือ ที่ระยะห่าง 6 7.5 9 10.5 12 และ 15 เซนติเมตร ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า ที่ระยะห่าง 7.5 เซนติเมตร ให้จุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุดถึง 890±75

ระดับแรงดันสูญญากาศภายในตู้กี มีบทบาทสำคัญต่อความเร็วของอนุภาคโลหะและการ ทะลุทะลวงสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย โดยลดแรงเสียดทานภายในตู้ยิง ทำให้ค วามเสียหายของ

เนื้อเยื่อเป้าหมายลดลง Mousavi และคณะ (2009) ศึกษาผลของระดับแรงดันสูญญากาศที่แตกต่างกัน 24 26 และ 28 นิ้วของปรอท ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ อินทผาลัม พบว่า ที่ระดับแรงดัน สูญญากาศ 26 นิ้วของปรอท ให้ประสิทธิภาพการถ่า ยยีนสูงถึง 580±179 จุดต่อชิ้นส่ วน และแรงดัน สูญญากาศที่ลดลงมากมีผลต่อการแสดงออกของยี น *gus* Ingram และคณะ (1999) ใช้ระดับแรงดันสูญญากาศที่ 26 นิ้วของปรอท ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอที่มาจากไมโครสปอร์ของข้าวสาลี Guirimand และคณะ (2009) ศึกษาผลขอ งระดับแรงดัน สูญญากาศต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ซัสเพนชั่นของแพงพวย (*Catharanthus roseus*) พบว่า ที่ระดับแรงดันสูญญากาศ 28 นิ้วของปรอท ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง Sreeramanan และคณะ (2005) ศึกษาระดับแรงดันสูญญากาศที่ระดับต่าง ๆ กัน 26 27 28 และ 29 มิลลิเมตรของปรอท ในการถ่ายยีนเข้าสู่หน่อ และส่วนของลำต้นที่ตัดมาของกล้วย พบว่า ที่ระดับแรงดัน สูญญากาศ 28 มิลลิเมตรของปรอท ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ในทั้งสองชิ้นส่วน แต่เมื่อลดระดับแรงสูญญากาศให้ต่ำลง จะให้การแสดงออกของยีน *gus* ลดลง โดยเฉ พาะที่ระดับแรงดัน สูญญากาศ 26 มิลลิเมตรของปรอทนั้น พบว่า ให้การแสดงออกของยีน *gus* ต่ำที่สุด Akashi และคณะ (2002) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ซัสเพนชั่น ของหญ้าดอลลีส (*P. dilatatum*) ใช้ระดับแรงดัน สูญญากาศแตกต่างกัน 3 ระดับ -0.67 -0.08 และ-0.1 เมกะปาสคาล พบว่า ที่แรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล หรือ 29 นิ้วของปรอท ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย สูงสุด คือ 2,436 จุดต่อ การยิง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gondo และคณะ (2009) และ Himuro และคณะ (2009) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้าโร้ดส์ (*C. gayana*) และหญ้าบาเฮีย (*P. notatum*) ตามลำดับ ใช้ที่แรงดัน สูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุ ด Parveez และคณะ (1997) ศึกษาผลของระดับแรงดันสูญญากาศต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ระดับแรงดัน สูญญากา ศ 3 ระดับ คือ 27 28 และ 29 นิ้วของปรอท พบว่า ที่ระดับแรงดัน สูญญากาศ 27 นิ้วของปรอท มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายอนุภาคโลหะสูงที่สุด โดยให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 322±285 จุดต่อชิ้นส่วน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แรงดัน สูญญากาศที่ 28 และ 29 นิ้วของปร อท โดยมีจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 313± 97 และ 168±48 จุดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ

นอกจากนี้ ชนิดของอนุภาคโลหะ ที่ใช้ในการยิงยีนมีหลายชนิด ได้แก่ ทอง ทังสเตน พัลลาเดียม ทองคำขาว และอิริเดียม เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้ คือ อนุภาคทอง และทังสเตน ซึ่งส่วนใหญ่จะเลือกใช้อนุภาคทอง มากกว่าทังสเตน เนื่องมาจากอนุภาคทองมีขนาด และรูปร่างที่แน่นอน เมื่อทะลุทะลวงเข้าสู่เซลล์เป้าหมายแล้ว ไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมาย ในขณะที่การใช้อนุภาคทังสเตนยังคงพบปัญหาเกี่ยวกับการเป็นพิษในพืช

บางชนิด (Parveez *et al.,* 1998) Mousavi และคณะ (2009) ทำการเปรียบชนิดของอนุภาคโลหะ 2 ชนิด คือ อนุภาคทอง และอนุภาคทังสเตน ในการถ่ายยี นเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิค แคลลัสของอินทผาลัม พบว่า การใช้อนุภาคทอง ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนถึง 319±48 จุดต่อชิ้นส่วน สูงกว่ าการใช้อนุภาคทังสเตน ประมาณ 3 เท่า ส่วนขนาดของอนุภาคโลห ะ การศึกษาการถ่ายยีนนิยมใช้อนุภาคโลหะที่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมต ร Suwanaketchanatit และคณะ (2007) ศึกษาชนิด และขนาดของอนุภาคโลหะที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยการใช้อนุภาคโลหะ 2 ชนิด คือ ทอง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร) กับทังสเตน (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.3 ไมโครเมตร) พบว่า อนุภาคทอง ให้ประสิ ทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าทังสเตน โดยจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 28.1 และ 23.44 ตามลำดับ และอนุภาคทองให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตขอ งโปรโตคอร์มสูงกว่าทังสเตน คือ 65.77 และ 57.14 ตามลำดับ Tee และ Maziah (2005) ศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของอนุภาคทอง 2 ขนาด คือ 1 และ 1.6 ไมโครเมตร เข้าสู่แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้แคลลัส 2 ชนิด คือ ชนิด A และชนิด B พบว่า อนุภาคทองที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร แสดงกิจกรรมของยีน *gus* และยีน *hpt* สูงกว่าอนุภาคทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.6 ไมโครเมตร ในแคลลัสทั้งสองชนิด ส่วนการศึกษาจำนวนครั้งในการยิง ที่นิยมใช้กัน คือ การยิงเพียงหนึ่งครั้ง เนื่องจากการยิงหลายครั้งเป็นการเ พิ่มบาดแผลให้แก่เนื้อเยื่อพืช Mousavi และคณะ (2009) ทำการเปรียบจำนวนครั้งในการยิง 2 ระดับ คือ 1 และ 2 ครั้ง ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิค แคลลัสของ อินทผาลัม พบว่า การยิง 2 ครั้ง ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนถึง 334±145 จุดต่อชิ้นส่วน สู งกว่าการการยิงเพียงหนึ่ งครั้ง แต่การยิง 2 ครั้ง ทำให้ เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ จึงแนะนำการให้การยิงเพียงครั้งเดียว ในการยิงยีนเช่นเดียวกับ Sreeramanan และคณะ (2005) พบว่า การยิง 2 ครั้ง ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสู งกว่าการการยิงเพียงหนึ่งครั้ง แต่การยิง 2 ครั้ง ทำ ให้เกิดบาดแผล ทำให้พืชสร้างสาร phenolic compound ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ดังนั้น จึงเลือก ใช้อนุภาคทอง เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร และยิงอนุภาคเพียงหนึ่งครั้งมาใช้ในการศึกษา

2. ปัจจัยทางเคมี

ปัจจัยทางเคมีที่เกี่ยวข้องในการถ่ายยีน ไ ด้แก่ ระยะเวลาการใช้สารออสโมติ คัมก่อน และหลังการถ่ายยีน ชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก และชนิดของสารเคลือบอนุภาคโลหะ เป็นต้น ทั้งนี้การปรับสภาพของออสโมติกของเนื้อเยื่อเป้าหมายด้ วยการใช้สารออสโมติคัมก่อน และ

หลังจากการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคมีบทบาทสำคัญต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเป้าหมาย สารที่นิยมใช้ปรับความดันออสโมติก เรียกว่า ออสโมติคัม ได้แก่ น้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ อย่างเช่น แมนนิทอล และซอร์บิทอล แมนนิทอลเป็น isomer ของซอร์บิทอล ในบางครั้งอาจใช้ผสมกันได้ ซึ่งระยะเวลาการใช้สารออสโมติคัมก่อน และหลังการถ่ายยีน เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน Gondo และคณะ (2009) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล ร่วมกับระยะเวลาเพาะเลี้ยงในออสโมติคัมก่อนการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคของหญ้าโร้ดส์ (*C. gayana*) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 4 ระดับ คือ 0 0.6 1.2 และ 1.5 โมลาร์ และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ 0 7 14 และ 21 วัน พบว่า น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนการยิงยีน ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด โดยมีจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 750 ± 110 จุดต่อเพลท รองลงมา น้ำตาลแมนนิทอล เข้ มข้น 1.2 โมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนการยิงยีน มีจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 450 ± 115 จุดต่อเพลท แต่อย่างไรก็ตาม ระดับความ เข้มข้น 1.5 โมลาร์ มีผลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และชักนำให้เกิด necrosis ดังนั้น จึงเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1.2 โมลาร์ Parveez และคณะ (1998) ศึกษาผลของระยะเวลาเพาะเลี้ ยงบนอาหารเติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้ มข้น 0.4 โมลาร์ ต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า การเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอเจนิคแคลลั ก่อนนำไปยิง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงบนอาหารออสโมติคัม) และการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้การแสดงออกของยีนลดลง โดยการเพาะเลี้ยงหลังจากการยิงยีน เป็นระยะเวลา 0-6 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพออสโมติก Romano และคณะ (2005) ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงใบของมันฝรั่งบนอาหารเติมน้ำ ตาลแมนนิทอลร่วมกับซอร์บิทอล เข้ มข้นอย่างละ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน และหลังการยิง ยีน Mousavi และคณะ (2009) ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัม บนอาหารเติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้ มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน แ ละหลังจากการยิงยีนเ เป็นเวลา 4 วัน Franklin และคณะ (2007) เพาะเลี้ยง Organogenic nodules ของ *Hypericum perforatum* บนอาหารเติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.19 โมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน

ชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อน และหลังการยิงยีนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน Mousavi และคณะ (2009) ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอินทผาลัม เริ่มจากการศึกษาชนิ ดของสารออสโมติคัม โดยการนำ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมชนิดของสารออสโมติคัมที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำตาลแมนนิทอล

น้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส พบว่า น้ำตาลแมนนิทอล ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยสูงสุด คือ 179±21 จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย รองลงมา น้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาล ซูโครส ให้การแสดงออกของยีน 52±9 2±0.5 และ 1±0 จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยตามลำดับ จากนั้นได้ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่แตกต่างกัน 4 ระดับ 0 0.6 1.2 และ 1.5 โมลาร์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย สูงสุด คือ 179±21 จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย Parveez และคณะ (1998) ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่แตกต่างกันต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน โดยการใช้น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลซอร์บิทอล และน้ำตาลแม นนิทอลร่วมกับน้ำตาลซอร์ บิทอล ที่ ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0 0.2 0.3 0.4 และ 0.6 โมลาร์ พบว่า น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด มีจำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 650±68 จุดต่อชิ้นส่วน หรือประมาณ 1.5 เท่าของการเติมน้ำตาลแมนนิทอลร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้นอ ย่างละ 0.3 โมลาร์ และประมาณ 2.5 เท่า ของความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ ในการ ทดลอง Ribas และคณะ (2005) ใช้น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของกาแฟ Chernobrovkina และคณะ (2007) ใช้น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.4 โมลาร์ ในการปรับสภาพออสโมติกของคัพภะที่ไม่สุกแก่ของข้าวบา ร์เล่ย์ก่อนนำไปยิงยีน Himuro และคณะ (2009) การถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้าบาเฮีย (*P. notatum*) ใช้น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.3 โมลาร์ ในการปรับสภาพออสโมติก หลังการ ยิงยีน Yu และคณ ะ (1999) ทำการปรับสภาพออสโมติกในโปร โตคอร์มของกล้วยสกุลหวายลูกผสม (*Dendrobuim hybrid* ‘MiHua’) ก่อนการยิงยีน ด้วยการนำมาเพาะเลี้ย งบนอาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.25 โมลาร์ Purkayastha และคณะ (2010) ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กลุ่มของปลายยอดของสบู่ดำ พบว่า น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus*

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือกเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประกาศหนึ่งที่มีส่วนช่วยให้เนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการยิงยีนได้มีการฟื้นฟู ก่อนที่จะได้รับสภาวะเครียดจากการคัดเลือก ด้วยสารปฏิชีวนะ Franklin และคณะ (2007) ศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือกต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ Organogenic nodules ของ *H. perforatum* โดยการนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการยิง ยีนมาแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัย ซิน (Early selection, ES) และส่วนที่สองนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำ พืชต้นใหม่ เป็นเวลา 45 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงบ นอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Late selection, LS) พบว่า การคัดเลือกแบบ LS ให้จำนวน

ชิ้นส่วนที่ต้านทานสารปฏิชีวนะมากกว่าการคัดเลือกแบบ ES Gondo และคณะ (2009) ศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ ปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก ต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนสู่เอ็มบริโอเจนิคของหญ้าโร้ดส์ (*C. gayana*) โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0 7 15 และ 30 วัน พบว่า ระยะเวลา 15 วัน ให้จำนวนเนื้อเยื่อที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไบอะลาฟอสมากที่สุด และให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด Romano และคณะ (2001) ใช้ระยะเวลา 1 วัน ในการเพาะเลี้ยงใบของมันฝรั่งที่ผ่านการยิงยีนบนอาหารปราศจากสารออสโมคัมก่อนทำการคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ คานามัยซิน Purkayastha และคณะ (2010) เพาะเลี้ยงกลุ่มของยอดสบู่ดำที่ผ่านการยิงยีนบนอาหารปราศจากส ารออสโมติคัม เป็นเวลา 2 วัน ก่อนคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะคานามัยซิน

ส่วนชนิดของสารเคลือบอนุภาคโลหะ โดยดีเอ็นเอที่จะทำการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อจะถูกยึดกับอนุภาคโลหะโดยใช้สารเคลือ บ วิธีการเคลือบดีเอ็นเอบนผิวของอนุภาคโลหะนิยมใช้สเปอร์มิดีน และแคลเซียลคลอไรด์ หรือการใช้สเปอร์มิดีนร่วมกับแคลเซียลคลอไรด์ Mousavi และคณะ (2009) และ Parveez และคณะ (1997) ศึกษาชนิดของสาร เคลือบอนุภาค ทอง คือ แคลเซียมคลอไรด์ สเปอร์มิดีน และการใช้แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับสเปอร์มิดีน ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิค แคลลัส อินทผาลัม และเอ็มบริโอเจนิ คแคลลัสปาล์มน้ำมัน พบว่า แคลเซียมไรด์เข้มข้น 2.5 โมลาร์ ร่วมกับสเปอร์มิดีน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้สูงสุด โดยให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 128±30 จุดต่อชิ้นส่วน (อินทผาลัม) และให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 933±132 จุดต่อชิ้นส่วน (ปาล์มน้ำมัน) และยังพบว่าสเปอร์มิดีนสามารถเคลือบดี เอ็นเอได้ดีกว่าแคลเซียมคลอไรด์ โดยการใช้ทั้งสองร่วมกันส่งเสริมให้ประสิทธิภาพในการเคลือบดีขึ้น เช่นกันกับการศึกษาของ Franklin และคณะ (2007) ใช้แคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับ สเปอร์มิดีน ในการตกตะกอนดีเอ็นเอบนอนุภาคทอง ในการถ่ายยีนสู่ Organogenic nodules ของ *H. perforatum* ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้สารเคลือบ คือ แคลเซียม คลอ ไรด์ เข้มข้น 2.5 โมลาร์ ร่วมกับสเปอร์มิดีน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ มาใช้ในการทดลอง

3. ปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางชีวภาพมีความเกี่ยวข้องกับเซลล์เนื้อเยื่อ ได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการเคลือบอนุภาค และแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ เป็นต้น ซึ่งความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่ใช้ในการเคลือบอนุภาคส่วนใหญ่นิยมใช้ที่ 1.5 ไมโครกรัม Parveez และคณะ (1998) ศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการเคลือบอนุภาคแตกต่างกัน คือ 0.5 1 1.25 1.5 1.75 2 และ 3 ไมโครกรัม

ในการถ่ายยีนเข้าสู่ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ของปาล์มน้ำมัน พบว่า ดีเอ็นเอ เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัม ส่งเส ริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด ให้จำ นวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 525±158 จุดต่อชิ้นส่วน เช่นเดียวกันกับในการศึกษาของ Sreeramanan และคณะ (2005) ศึกษาเข้มข้นของดีเอ็นเอ ในการเคลือบอนุภาคที่แตกต่างกัน คือ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 ไมโคร กรัม ในการถ่ายยีนเข้าสู่หน่อ และส่วนของลำต้นที่ตัดมาของกล้วย พบว่า ดีเอ็นเอ เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัม ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* และยีน *gfp* สูงสุด ส่วนก ารศึกษาแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อส่วนใหญ่นิยมใช้แคลลัส หรือ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส Mousavi และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อต่างกัน 3 แหล่ง คือ แคลลัส ใบ คัพภะ และราก ในการถ่ ายยีนเข้าสู่ อินทผาลัม พบว่า การใช้ แคลลัส เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย ให้การแสดง ออกของยีน *gus* สูงสุด โดยให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 1383±565 จุดต่อชิ้นส่วน Visarada และ Sarma (2004) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เข้าข้าวโดยใช้แคลลัสที่ชักนำจากข้าวสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน คือ T309 Seshu Nagarjuna Rasi และ Vibhava พบว่า ข้าวสายพันธุ์ T309 ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด คือ ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ย 576±212 จุดสีน้ำเงินต่อชิ้นส่วน Parveez และคณะ (1998) ศึกษาประสิทธิภาพถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้ แคลลัสจากแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน 3 แหล่ง คือ แคลลัสที่ชักนำมาจากใบอ่อน แคลลัสที่ชักนำจากราก และแคลลั สที่ชักนำจาก คัพภะ พบว่า แคลลัสที่ชักนำจาก คัพภะ มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 952.8 จุดต่อชิ้นส่วน อย่างไรก็ตาม Parveez และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของจีโนไทป์ต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *gus* ดังนั้นในการศึ กษานี้จึงเลือกใช้ แคลลัสเป็นเนื้อ เยื่อเป้าหมาย และใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการเคลือบอนุภาค 1.5 ไมโครกรัม

การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ทำได้ 2 ระดับ คือ แบบชั่วคร าว และแบบถาวร การแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว เป็นการตรวจสอบเบื้องต้น สามารถทำได้ภา ยหลังถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์ ประมาณ 24–48 ชั่วโมง เรียกการแสดงออกนี้ว่า transient expression การตรวจสอบนี้เป็นการ ตรวจสอบ จาก โปรตีน หรือเอนไซม์ ที่เป็น ผลผลิตจากยีนด้วยเทคนิคทาง ชีวเคมี หรือ ซีรัมวิทยา ตัวอย่างของยีนที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้แก่ ยีน *gus*A (*uid*A) ที่เป็นยีนสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase (GUS) ใช้ตรวจสอบกับสารตั้ งต้นในปฏิกิริยาด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น histochemical assay ผลที่ได้จะแสดงออกในรูปสารสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่ อพืชที่มียีน สามารถทำการตรวจสอบได้ง่าย มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีผลต่อกระบวนการเมตาบอ ลิซึม Batista และคณะ

(2008) ตรวจสอบการแสดงออกของ ยีนแบบชั่วคราวด้วย การใช้เทคนิค histochemical assay ในการตรวจสอบ β-glucuronidase ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Jefferson และคณะ (1987) นำก้านใบและแคลลัส หลังจากการยิงยีน 48 ชั่วโมง มาจุ่มแช่ใน สารที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ คือ สาร 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินดอลิว-β-D-กลูคูโรไนด์ (X-Gluc) ในสารละลายไดเมทิวซัลฟอกไซด์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารละลายทริทอนเอกซ์-100 นำไปวางที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสายละลายดังกล่าวทิ้ง แล้วเติม เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ ผลที่จะแสดงออกในรูปสารสีน้ำเงิน นอกจากนี้ ยีน *gfp* ที่แยกจากแมงกะพรุน (*Aequra victoria*) สามารถสังเคราะห์โปรตีน green fluorescent protein (GFP) ในเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน ตรวจสอบโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง UV หรือแสงสีฟ้า (blue light) ไม่สร้างความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเป้าหมาย

อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และการแสดงออกของยีนแบบถาวรในพืชที่ทำการถ่ายยีนหลาย ๆ รุ่น เรียกว่า stable transformation เริ่มจากการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน มียีนคัดเลือกบางชนิดที่แสดงออกได้ในเซลล์พืช ซึ่งกำหนดลักษณะบางประการที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนที่ส่งเข้าไป และทำให้เซลล์พืชดังกล่าวเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารบางชนิดที่สอดคล้องกับคุณสมบัติของยีนคัดเลือกนั้น ขั้นตอนการคัดเลือกนี้มีความสำคัญ มากในกระบวนการถ่ายยีน เพราะใช้ในการแยกเซลล์ที่ถ่ายยีนออกจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เซลล์พืชผ่านการคัดเลือกจะถูกชักนำให้มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ พืชต้นใหม่นี้จะยังมีการแสดงออกของยีน และการส่งถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อ ๆ ไป Grewal และคณะ (2006) ศึกษาการถ่ายยีน *Cry*1Ac ในแคลลัสของข้าว โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ทำการคัดเลือกในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจะนำมาวางเลี้ยงบนอาหาร ชักนำยอด และราก แล้วจะได้ต้นพืชดัดแปลงพันธุ์รุ่นที่ 1 (T_0) เมื่อการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบ ยีน *Cry*1Ac และในรุ่นที่ 2 (T_1) พบการแสดงออกของ ยีน *gus* ในเมล็ดข้าว และยีน *Cry*1Ac เนื่องจากยีนที่ถ่ายเข้าไป สามารถสอดแทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของพืช ได้อย่างถาวร นอกจากนี้ การตรวจสอบการถ่ายยีนในระดับโมเลกุลจะตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ โดยเทคนิคที่นิยมใช้ คือ เทคนิคพีซีอาร์ อาศัยหลักการพื้นฐานในการจำลองดีเอ็นเอ เริ่มจากการสกัดแยกดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนพืช เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคนี้ สามารถทำการ ตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิต โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า อะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟริสิส (Agarose gel electrophoresis) ซึ่งเป็นการแยกดี เอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบน

แผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอ และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้ มองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งเรืองแสง ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต นอกจากนี้อาจตรวจสอบคุณภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้โดยการใช้เทคนิค Southern blot hybridization (Men *et al.,* 2003; Mishba *et al*., 2005) และการตรวจสอบผลผลิตของยีนเป้าหมาย เช่น ตรวจสอบเอ็มอาร์เอนเอ (mRNA) ด้วยเทคนิค Northern blot hybridization หรือเทคนิค reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) ตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนด้วยเทคนิค ELISA และ Westhern blot analysis (Liao *et al*., 2004) และการทดสอบทางชีววิทยา เป็นต้น

การถ่ายยีนโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาคจะเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน แต่ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ และคุณภาพที่ได้ค่อนข้างน้อย ซึ่งการศึกษาปัจจัย และวิธีการ ที่เหมาะสมมีความสำคัญในการถ่ายยีนอย่างมีประสิทธิภาพเข้าสู่ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ปาล์มน้ำมัน เพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการถ่ายยีนในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาปัจจัยทางด้านกายภาพ และด้านเคมีที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน เพื่อพัฒนาระบบการถ่ายยีนอย่างมีประสิทธิภาพสำหรับในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ได้ลักษณะที่ต้องการในอนาคต

บทที่ 2

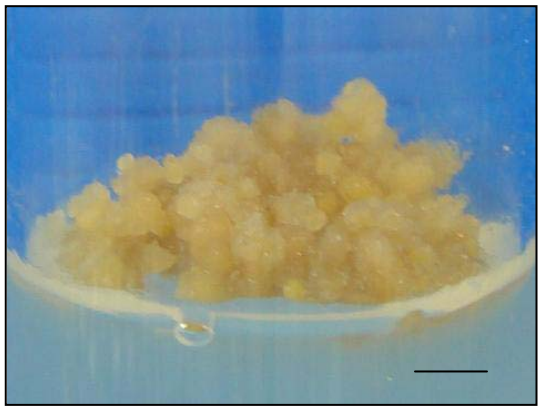
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 1) ที่ชักนำจากใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสมเทเนอร่า ซึ่งปลูกที่สถานีวิจัยและฝึกภาคสนามเทพา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ บนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 ใช้เซลล์อายุ 2-3 สัปดาห์ หลังจากการย้ายเลี้ยง โดยทำการย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารข้างต้นทุก ๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลาอย่างน้อย 5 ปี ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการถ่ายยีน



ภาพที่ 1 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์ 0.36 เซนติเมตร)

1.2 พลาสมิดดีเอ็นเอ

ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล อยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ nopaline synthase polyadenylation (Nos polyA) และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก อยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ CaMV35S polyadenylation (CaMV35S polyA) รายละเอียดโครงสร้างพลาสมิดแสดงในภาพภาคผนวกที่ 1

1.3 สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันใช้อาหารสูตร MS (รายละเอียดขององค์ประกอบแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1) เติมไดแคมบา เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร นาน 15 นาที

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

การเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมใช้อาหารแข็งและเหลวสูตร LB (Luria Bertani) (รายละเอียดขององค์ประกอบแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร กรณีที่เตรียมอาหารแข็งเติมวุ้นความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 7 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร นาน 15 นาที

1.4 สารเคมี

1.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบสูตรอาหาร MS
- น้ำตาลซูโครส
- กรดแอสคอร์บิค
- สารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย ไดแคมบา
- ผงวุ้น

- น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซอร์บิทอล

1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร LB
- สารเคมีปฏิชีวนะคานามัยชิน

1.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

- สารละลายกลูโคส
- ทรีส-กรดไฮโดรคลอริค
- สารละลายกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิตริค
- โซเดียมไฮดรอกไซด์
- สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
- โพแทสเซียมอะซีเตด
- เอทธานอลบริสุทธิ์ และเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- ทรีส-เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตด ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการเคลือบอนุภาค

- พลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301
- อนุภาคทอง ขนาด 1 ไมโครเมตร
- สารละลายสเปอร์มิดีน ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS คือ

- สารละลาย 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินดอลิว-β-D-กลูคูโรไนด์
- สารละลายไดเมทิว ซัลฟอกไซด์
- สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- สารละลายทริทอนเอกซ์-100
- เมททานอล

1.46 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

- สารละลายทรีส-เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตดบัฟเฟอร์ ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อ
- สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
- แอมโมเนียม อะซิเตด
- ไอโซโพรพานอล

1.4.7 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเลคโทรโฟรีซีส

- อะกาโรสเจล
- กรดอะซิติค
- กรดบอริค
- ทรีสเบส
- เอธิเดียมโบรไมด์
- สารละสายพีซีอาร์บัฟเฟอร์
- แลมด้าดีเอ็นเอ
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) (Promega, USA)

1.4.8 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- สารละลาย dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- ไพเมอร์ของ *gus* ยีน คือ F-primer 5'-CTGCGACGCTCACACCGATAC-3' และ R-primer 5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'
- Primer ของ *htp* ยีน คือ F-primer 5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3' และ R-primer 5'-AGACCAATGCGGAGCATATA-3'
- แมกนีเซียมคลอไรด์
- ลายละลายบัฟเฟอร์ 10X *Taq* (Promega, USA)
- เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase B (Promega, USA)
- อะกาโรสเจล

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- ปิเปตปรับปริมาตร และไมโครปิเปต พร้อมทิป นึ่งฆ่าเชื้อ
- เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น
- ชุดกรองมิลิพอร์
- ลูป และเข็มเขี่ย
- ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- หม้อนึ่งความดันไอ

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบ

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
- มีดผ่าตัด
- ปากคีบ
- ผ้าสำหรับเช็ดทำความสะอาด ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค

- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิเมตร ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- กระติกน้ำแข็ง
- ถุงมือยาง
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- นาฬิกาจับเวลา
- เครื่องผสมสาร
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
- เครื่องยิงอนุภาค (ภาพแสดงในภาพภาคผนวกที่ 2)
- เครื่องดูดสูญญากาศ
- ตู้สูญญากาศ พร้อมหัวยิง ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- ถังก๊าซฮีเลี่ยม

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และการทำพีซีอาร์

- เครื่องอิเล็คโตรโฟริซีส
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ
- เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต พร้อมกล้องโพลารอยด์

2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- กล้องถ่ายรูป
- ไมโครเพลท

วิธีการวิจัย

1. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากอะโกรแบคทีเรียม

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากอะโกรแบคทีเรียม EHA1301 ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Bimboim และ Doly (1979) เลี้ยงเชื้อโคโลนีเดี่ยวในอาหาร LB broth เติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 1-2 วัน แล้วดูดเซลล์ซัสเพนชั่นของอะโกรแบคทีเรียม 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย ทรีส-กรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับ pH 8.0 ร่วมกับสารละลายกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระซิตริคบัฟเฟอร์ (TE buffer) เข้มข้น 0.5 M ปรับ pH 8.0 และกลูโคส เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส (กล่องน้ำแข็ง) 10 นาที เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 นอร์มอล ร่วมกับ สารละลาย สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เข้มข้น 1% 200 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไป-มาเบา ๆ เก็บที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตด เข้มข้น 3 โมลาร์ 150 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไป -มาเบา ๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทธานอลบริสุทธิ์ 2.5 เท่าของสารละลายที่ดูดมา เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาด ดีเอ็นเอ ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายด้วยสารละลาย TE buffer เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การเคลือบอนุภาคทองด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ

การเคลือบอนุภาคทองด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Parveez และคณะ (1997) โดยสารละลายทุกอย่างต้องแช่เย็น ชั่งอนุภาคทองขนาด 1 ไมโครเมตร ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นาน 1 นาที แล้วทำการเขย่าด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง นาน 3-5 นาที เพื่อให้อนุภาคกระจายตัว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง นาน 1 นาที แล้วดูดสารละลายอนุภาคทอง 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ เติมดีเอ็นเอ 15 ไมโครลิตร (1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) เขย่าด้วยเครื่องผสมสา รให้เข้ากัน หยดสารละลายแคลเซีย มคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงที ละหยดขณะเขย่า และหยดสารละลายสเปอร์มิดีน เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงที่ละหยดขณะเขย่าเช่นกัน เขย่าด้วยเครื่องผสมสารต่อ เป็นเวลา 3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 60 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พร้อมที่จะนำไปใช้ในการยิง โดยใช้ครั้งละ 30 ไมโครลิตร

3.ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค

3.1 ศึกษาผลของแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน โคลนเทพา มาวางเลี้ยงบนอ าหารสูตร MS เติม ไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลแมนนิทอลเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เรียกอาหารนี้ว่าอาหารปรับสภาพก่อนการยิงยีน หรืออาหารออสโมติคัม วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรั บ pH 5.7 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 3 ระดับ คือ ที่แรงดันก๊าซ 2 5 และ 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (kg/cm^2) แรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 10 เซนติเมตร หลังการยิงยีน นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตรเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม คือ อาหาร สูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 เป็นเวลา 3 วัน และย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรคัดเลือก คือ อาหารสูตร MS เติม ไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิ ค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อ ลิตร และไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นคัดเลือกที่รายงาน โดย สุรีรัตน์ และสมปอง (2552) วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่าง

มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 48 ชั่วโมงหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบการปรากฏของยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลังยิงยีน 1 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT (Duncan's multiple range test) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 ศึกษาผลของระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 แรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิด ดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 4 ระดับ คือ 3.4 6.7 10 และ 13.4 เซนติเมตร หลังการยิงยีนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตรเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ไปเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 3 วัน และย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรคัดเลือก ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 48 ชั่วโมงหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบการปรากฏของยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลังยิงยีน 1 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3 ศึกษาผลของความดันสูญญากาศต่อการถ่ายยีน

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัม เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 ปรับระดับแรงดันสูญญากาศ 3 ระดับ คือ -0.1 -0.09 และ -0.08 เมกะปาสคาล ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์ กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิด ดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเ ป้าหมายที่ดีที่สุดจา กการศึกษาที่ 3.2 หลังการยิงยีนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตรเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 3 วัน และย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรคัดเลือก ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 48 ชั่วโมงหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบ การ

ปรากฏของยีน *gus* และ ยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลังยิงยีน 1 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 ศึกษาผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติกัมก่อนการยิงยีน

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัม เป็นเวลา 0 4 16 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 แรงดันสูญญากาศ ที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.3 ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเ ป้าหมายที่ดีที่สุดจาก การศึกษาที่ 3.2 หลังการยิงยีนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตรเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลงบนอ าหาร ที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 3 วัน และย้ายเลี้ยงลงบนอา หารสูตรคัดเลือก ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 48 ชั่วโมงหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบ การปรากฏของยีน *gus* และ ยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลังยิงยีน 1 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติกัมหลังการยิงยีน

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัม โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ เหมาะสมจากการศึกษาที่ 3.4 ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 แรงดัน สูญญากาศ ที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.3 ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ดีที่สุดจา กการศึกษาที่ 3.2 หลังการยิงยีนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตรเดิม เป็นเวลา 0 12 24 72 และ 168 ชั่วโมง ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลงบน อาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 3 วัน และย้ายเลี้ยงลงบนอา หารสูตรคัดเลือก ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 48 ชั่วโมงหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบการปรากฏของยีน *gus* และ ยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลัง

ยิงยีน 1 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6 ศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมต่อการถ่ายยีน

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสคอร์บิค เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ น้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และน้ำตาลแมนนิทอลร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ดีเหมาะสมจากการศึกษาที่ 3.4 ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 แรงดันสูญญากาศที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.3 ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.2 หลังการยิงยีนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตรเดิม โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ดีเหมาะสมจากการศึกษาที่ 3.5 ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเลี้ยงลงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 3 วัน และย้ายมาเลี้ยงลงบนอาหารสูตรคัดเลือก ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 48 ชั่วโมงหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบการปรากฏของยีน *gus* และ ยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลังยิงยีน 1 เดือน เปรียบเทียบกันระหว่างชนิด และความเข้มข้น โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial ใน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.7 ศึกษาผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 6 โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ดีเหมาะสมจากการศึกษาที่ 3.4 ก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันก๊าซที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.1 แรงดันสูญญากาศที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.3 ยิงอนุภาคทองเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 ไมโครเมตร ที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301 เข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 3.2 หลังการยิงยีนนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมสูตร

เดิม โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ดีเหมาะสมจากการศึกษาที่ 3.5 ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ลงบนอาหาร ที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 0 3 7 15 และ 24 วัน และย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรคัดเลือก ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* 26 วันหลังการยิงยีน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบ การปรากฏของยีน *gus* และ ยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR หลังยิงยีน 1 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. การตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *gus* ที่ถ่ายเข้าในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *gus* ใช้วิธี histochemical localization ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Jefferson และคณะ (1987) หลังจากการยิงยีน 48 ชั่วโมง สุ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จำนวน 5-8 ชิ้น ใส่ในจานหลุม (96 well) เติมซับสเตรตของเอนไซม์ คือ สารละลาย X-Gluc ในสารละลายไดเมทิวซัลฟอกไซด์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และหยดสาร ละลายทริทอนเอกซ์ -100 1-2 ไมโครลิตร เติมส่วนของสารละลาย X-Gluc ให้ท่วมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส นำไปวางที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายออก แล้วเติมเมททานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 150 ไมโครลิตร ทำซ้ำจนกว่าเนื้อเยื่อพืชใส หรือมองเห็นจุดสีน้ำเงินด้วยตาเปล่า หรือภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

5 การตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการยิงยีน ประมาณ 0.05 กรัมน้ำหนักสด มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีของ Te-chato (2000) ใส่ในหลอดข นาด 1.5 มิลลิลิตร เติม สารละลายทรีส- เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตดบัฟเฟอร์ (TE buffer) 150 ไมโครลิตร และเติม สารละลาย SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดบนน้ำแข็ง เก็บที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตด เข้มข้น 5 โมลาร์ 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ ประมาณ 100-150 ไมโครลิตร เติมไอโซโพรพานอล 0.5 มิลลิลิตร กลับหลอดไป-มาเบา ๆ จะเห็นดีเอ็นเอ จากนั้นปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 5 นาที เทไอโซโพรพานอลตอนบนทิ้ง เติมเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดดีเอ็นเอ ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ทำให้ดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายด้วยสารละลาย TE buffer เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.2 การเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่ม ปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ ยีน *gus* คือ F-primer 5'-CTGCGACGCTCACACCGATAC-3' และ R-primer 5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'ให้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่มีขนาด 441 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ที่ความจำเฉพาะเจาะจงกับ ยีน *hpt* คือ F-primer 5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3' และ R-primer 5'-AGACCAATGCGGAGCATATA-3' ให้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ขนาด 800 คู่เบส ปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ ดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dNTP เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1.0 ยูนิต ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่จำเพาะสำหรับแต่ละยีน (รายละเอียดการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แสดงใน ตาราง ภาคผนวกที่ 3) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลายทริส-กรดบอริกเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตดบัฟเฟอร์ (TBE buffer) เป็นเวลา 40 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel document

บทที่ 3

ผล

1. ผลของแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม

จากการ นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ผ่านการ ยิงยีน ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 3 ระดับ คือ 2 5 และ 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร มาเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออก แบบชั่วคราว ของยีน *gus* ด้วยวิธีเนื้อเยื่อเคมี (histochemical method) พบว่า ที่แรงดันก๊าซ 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 65.74% รองลงมา คือ ที่แรงดันก๊าซ 7 และ 2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* 62.74% และ 36.35% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ลักษณะการติดสีน้ำเงินของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นบริเวณกว้างทั้งก้อน หรือติดสีน้ำเงินเพียงบางส่วน โดยแคลลัสที่ไม่ได้รับ การถ่ายยีนไม่มีการติดสีน้ำเงิน (ภาพที่ 2) หลังจากการวางเลี้ ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การถ่ายยีนที่ระดับแรงดันก๊าซ 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ให้การต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 91.67% รองลงมา คือ ที่ ระดับแรงดันก๊าซ 7 และ 2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ให้เปอร์เซ็นต์การต้านทานไฮโกรมัยซิน เท่ากัน 82.22% แตกต่าง กันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์แรก และสัปดาห์ที่สอง เซลล์มีสีน้ำตาลอมเหลืองต่อมา ในสัปดาห์ สามสามารถสังเกตเห็นสีของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เริ่มเปลี่ยน จากสีน้ำตาลอมเหลืองเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เข้ม แต่ยังมีความมีชีวิตอยู่ ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ตายมีลักษณะซีดขาว และพบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บางส่วนสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในสัปดาห์ที่สี่ (ภาพที่ 3) การตรวจสอบการปรากฏของยีน *gus* และยีน *hpt* โดยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ ได้จากการคัดเลือก พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ซึ่งเป็นยีนรายงานผล ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือก สามารถให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายไม่ปรากฏดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 4) ดังนั้นจึงเลือกระดับแรงดัน ก๊าซ 5 กิโลกรัมต่อ ตารางเซนติเมตร ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 ผลของระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม (kg/cm^2)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน[2/]
0	0d	36.67c
2	36.35c	82.22b
5	65.74a	91.67a
7	62.74b	82.22b
F-test	*	*
C.V. (%)	5.13	6.20

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

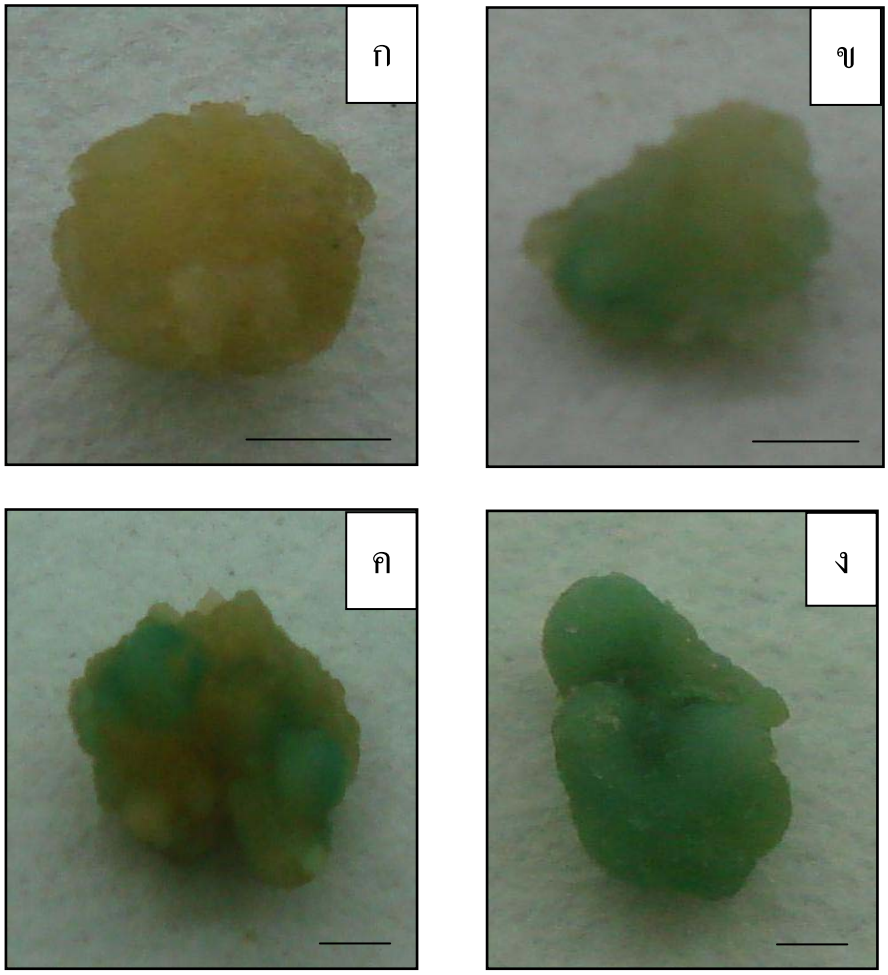
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน 48 ชั่วโมง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน } gus = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่การติดน้ำเงิน x 100}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมดที่ตรวจสอบ}}$$

[2/] เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการยิงยีน 4 สัปดาห์

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวน EC ที่รอดชีวิต x 100}}{\text{จำนวน EC ทั้งหมดที่วางเลี้ยง}}$$



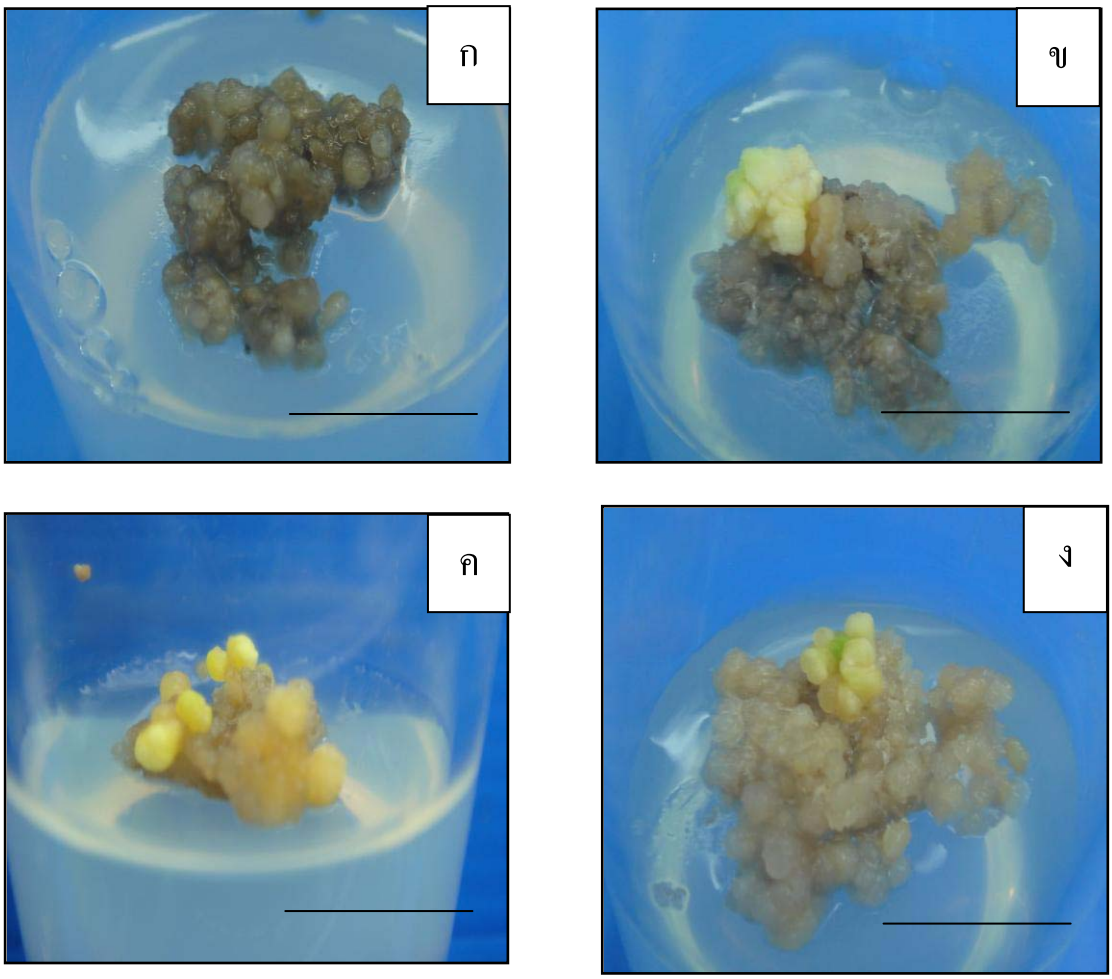
ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน *gus* ด้วยเทคนิค histochemical method ในเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการยิงยีนที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ระดับต่าง หลังการถ่ายยีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (บาร์ = 0. 5 มิลลิเมตร)

ก: ไม่ได้รับการยิงยีน

ข: แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ค: แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ง: แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร



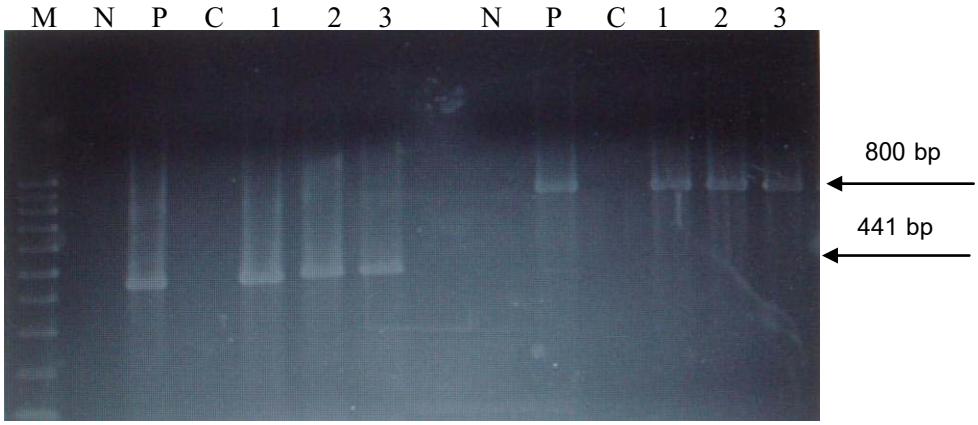
ภาพที่ 3 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการยิงยีนที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ระดับต่าง ๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1.22 เซนติเมตร)

ก: ไม่ได้ยิงยีน

ข: แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ค: แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ง: แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร



ภาพที่ 4 การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส N: negative control

P: positive control C: ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยิงยีน

1: ที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 3 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2: ที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

3: ที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2. ผลของระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ผ่านการยิงยีนที่ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 3.4 6.7 10 และ 13.4 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการสุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย histochemical method พบว่า ที่ระยะห่าง 10 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด 62.33% รองลงมา คือ ที่ระยะห่าง 6.7 13.4 และ 3.4 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน คือ 51.19 36.76 และ 30.36 ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) ลักษณะการติดสีน้ำเงินของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้ผลทำนองเดียวกับการทดลองข้างต้น หลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่เติมไฮโกร มัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การต้านทาน ไฮโกรมัยซินสูงสุด 92.99 ที่ระยะห่าง 10

เซนติเมตร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น และพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วนสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในสัปดาห์ที่สี่ (ภาพที่ 5) ส่วนที่ระยะห่าง 3.4 เซนติเมตร ให้การต้านทาน ต่อไฮโกรมัยต่ำที่สุด 68.56% และพบเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบางส่วนมีลักษณะอวบน้ำ สีน้ำตาลเข้ม และอาหารสีน้ำตาล (ภาพที่ 5ง.) นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามาร ถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ส่วนการตรวจสอบการปรากฏของ ยีน *gus* และยีน *hpt* โดยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการคัดเลื อก พบว่า ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ ของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 4 โดยตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายไม่ปรากฏ ดีเอ็นเอ ของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 6) จึงเลือกระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 10 เซนติเมตร ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการส่งถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

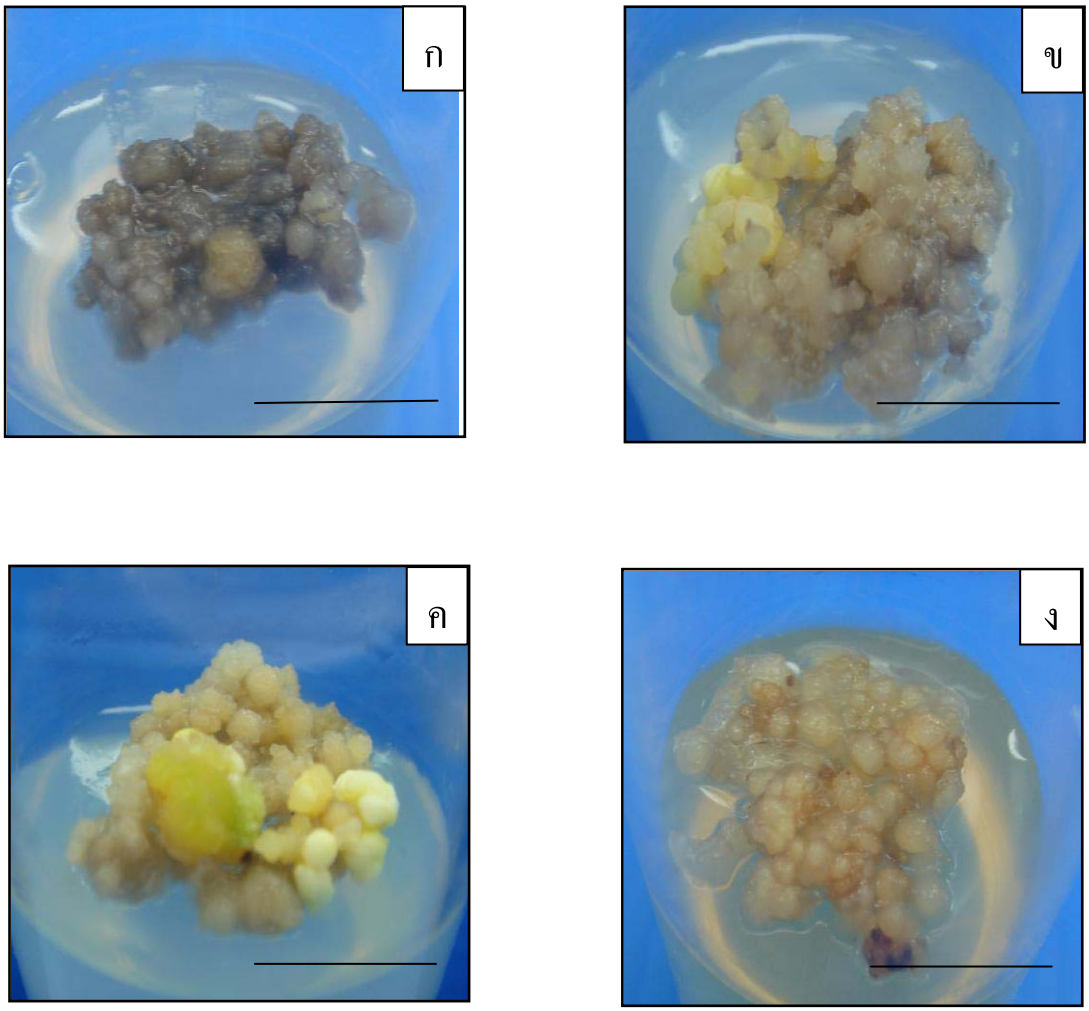
ตารางที่ 2 ผลของระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน
3.4	30.36c	68.56c
6.7	51.19b	80.56b
10	62.33a	92.22a
13.4	36.76c	88.33ab
F-test	*	*
C.V. (%)	12.83	5.34

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน 48 ชั่วโมง



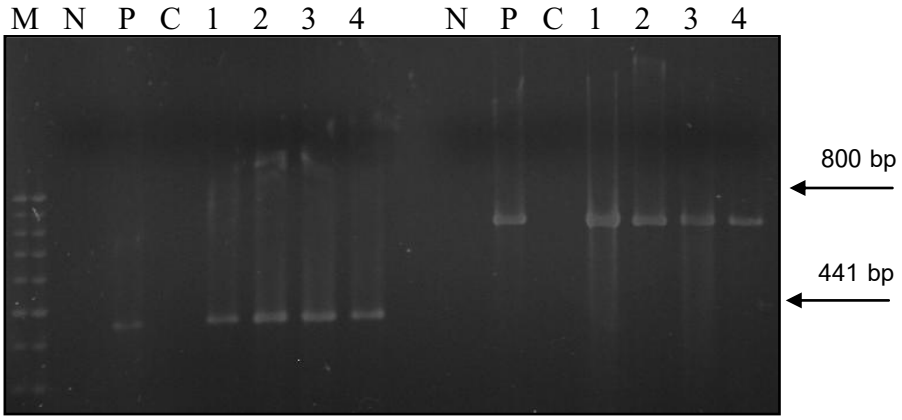
ภาพที่ 5 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการยิงยีนที่ระยะห่างต่างกัน เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
(บาร์ = 1.22 เซนติเมตร)

ก: ไม่ได้ยิงยีน

ข: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 13.4 เซนติเมตร

ค: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 10 เซนติเมตร

ง: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 3.4 เซนติเมตร



ภาพที่ 6 การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีนเป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส N: negative control

P: positive control C: ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยิงยีน

1: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 0 เซนติเมตร

2: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 3.4 เซนติเมตร

3: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 9.6 เซนติเมตร

4: ยิงยีน ที่ระยะห่าง 13.4 เซนติเมตร

3. ผลของความดันสูญญากาศต่อการถ่ายยีน

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ระดับแรงดันสูญญากาศ 3 ระดับ คือ -0.1 -0.09 และ -0.08 เมกะปาสคาล หลังการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ออสโมติคัม เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย histochemical method พบว่า ที่ระดับแรงดันสุญญากาศที่แตกต่างกันให้ผลที่ต่างกัน ที่ระดับแรงดัน สูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ให้การแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด คือ 66.22% เมื่อลดระดับแรงดัน สูญญากาศลงเป็น -0.09 และ -0.08 เมกะปาสคาล ให้การแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลงเป็น 51.02% และ 48.91% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) ลักษณะ ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลั สมี

การติดสีน้ำเงินคล้ายกับในการทดลองแรก หลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวล า 4 สัปดาห์ พบว่า ที่แรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ให้การต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 91.67% รองลงมา คือ ที่แรงดันสูญญากาศ -0.09 และ -0.08 เมกะปาสคาล ให้การต้านทานไฮโกรมัย ซิน 84.17% และ 81.67% ตามลำดับ สามารถสังเกตเห็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอเช่นเดียวกับการทดลองแ รก ส่วนการตรวจสอบการ ปรากฏของ ยีน *gus* และยีน *hpt* โดยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของเอ็มบริโอเ จนิคแคลลัสที่ได้จากการคัดเลือก พบว่า ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ ของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยิงยีนไม่ปรากฏดีเอ็นเอของยีนทั้งสองดังกล่าว (ภาพที่ 7) ดังนั้น จึงเลือก ระดับแรงดัน สูญญากาศ 0.1 เมกะปาสคาล ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 ผลของแรงดันสูญญากาศต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

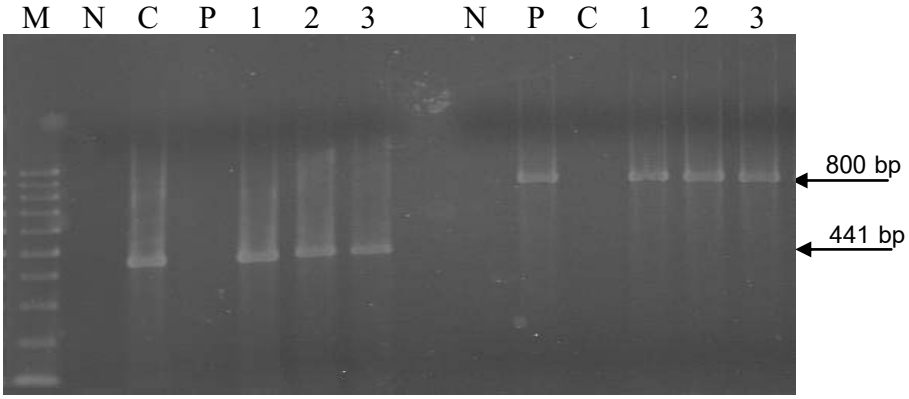
แรงดันสูญญากาศ (เมกะปาสคาล)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน
-0.08	48.91b	81.67
-0.09	51.02b	84.17
-0.1	66.22a	91.67
F-test	*	ns
C.V. (%)	21.46	4.03

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระดับแรงดันสูญญากาศที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส N: negative control

P: positive control C: ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยิงยีน

1: ที่แรงดันสูญญากาศระยะห่าง -0.08 เมกะปาศคาล

2: ที่แรงดันสูญญากาศระยะห่าง -0.09 เมกะปาศคาล

3: ที่แรงดันสูญญากาศระยะห่าง -0.1 เมกะปาศคาล

4. ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 0 4 16 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปยิงยีนด้วยระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร แรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายเป็น 10 เซนติเมตร หลังการยิงยีนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติ คัมเป็นเวลา 8 ชั่วโมง การสุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย histochemical method พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารออสโมติ คัมก่อนการยิงยีน ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* เพิ่มขึ้น และการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด คือ 68.75% รองลงมา คือ ที่ระยะเวลา 24 4 48 และ 0 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน คือ 66.30% 65.28% 57.92% และ 51.06% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สามารถสังเกตเห็นสีของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ไม่ได้เลี้ยงบนอาหารออสโมติ คัมนั้น มีการปล่อยสารบางชนิดที่ทำให้สีของอาหาร เปลี่ยน เป็นสีน้ำตาล หลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบน อาหาร

คัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น เวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหาร ออสโมติคัม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน ให้การต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 95.83% รองลงมา คือ ที่ระยะเวลา 4 24 48 และ 0 ชั่วโมง ให้การต้านทานไฮโกรมัยซิน 1.67% 90.83% 90.83% และ 84.17% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ สามารถสังเกตเห็น ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอเช่นเดียวกับการทดลองแรก ส่วนการตรวจสอบการปรากฏของยีน *gus* และยีน *hpt* โดยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของเอ็มบริโอเ จนิคแคลลัสที่ได้จากการคัดเลือก พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* มีขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* มีขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้รับการ ยิงยีนไม่ปรากฏ ดีเอ็นเอ ของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 8) ดังนั้น จึงเลือก ที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีนต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

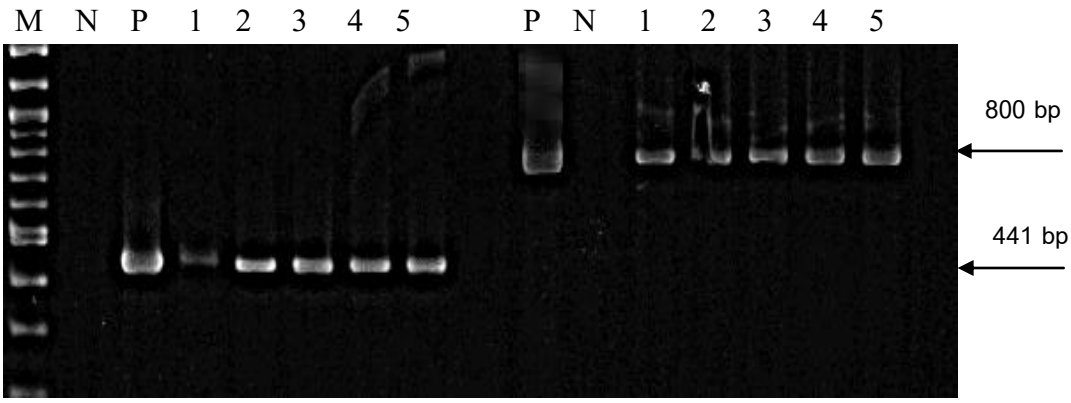
ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน
0	51.06	84.17b
4	65.28	91.67a
16	68.73	95.83a
24	66.30	90.83ab
48	57.92	90.83ab
F-test	ns	*
C.V. (%)	21.46	4.02

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีนที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีนเป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส N: negative control P: positive control

1: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

2: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ ผ่านการยิ งยีนมา เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัม เป็นเวลา 0 12 24 72 และ 168 ชั่วโมง แล้วทำการสุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย histochemical method พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิ คแคลลัสบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* เพิ่มขึ้น และการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด คือ 38.63% รองลงมา คือ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน คือ 27.87% อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมเป็นเวลานาน คือ ที่ระยะเวลา 72 และ 168 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ที่ต่ำ คือ 25.29 และ 0 ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5) โดยเฉพาะที่ร ะยะเวลา

168 ชั่วโมง สามารถสังเกตเห็นสีของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีลักษณะเซลล์เป็นสีน้ำตาลเข้ม และมีการปล่อยสารบางชนิดที่ทำให้อาหารเป็นสีเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 9) หลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคบนอาหารออสโมติคัม เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังการยิงยีน ให้การต้านทานไฮโกรมัยซิน สูงสุด 78.33% รองลงมา คือ ที่ระยะเวลา 0 24 72 และ 168 ชั่วโมง ให้การต้านทานไฮโกรมัยซิน 71.67% 70% 63.33% และ 0% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ผ่านการยิงยีน มีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอเช่นเดียวกับการทดลองข้าง ต้น ส่วนการตรวจสอบการปรากฏ ของยีน *gus* และยีน *hpt* โดยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการคัดเลือก พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายไม่ปรากฏดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 10) โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังการยิงยีน ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซินที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะเวลาที่ 12 ชั่วโมง แต่ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังการยิงยีน ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

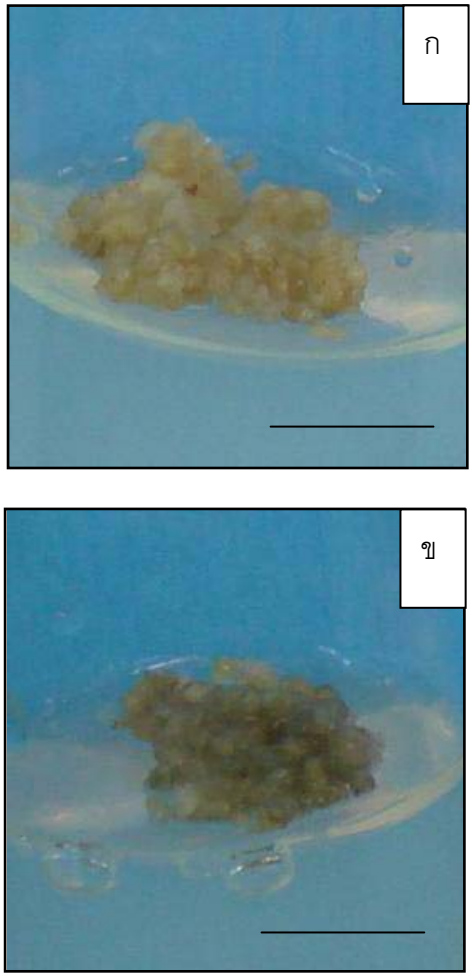
ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีนต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน
0	25.29ab	71.67a
12	27.87a	78.33a
24	38.63a	70.00a
72	11.99ac	63.33a
168	0c	0b
F-test	*	*
C.V. (%)	37.7	20.15

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

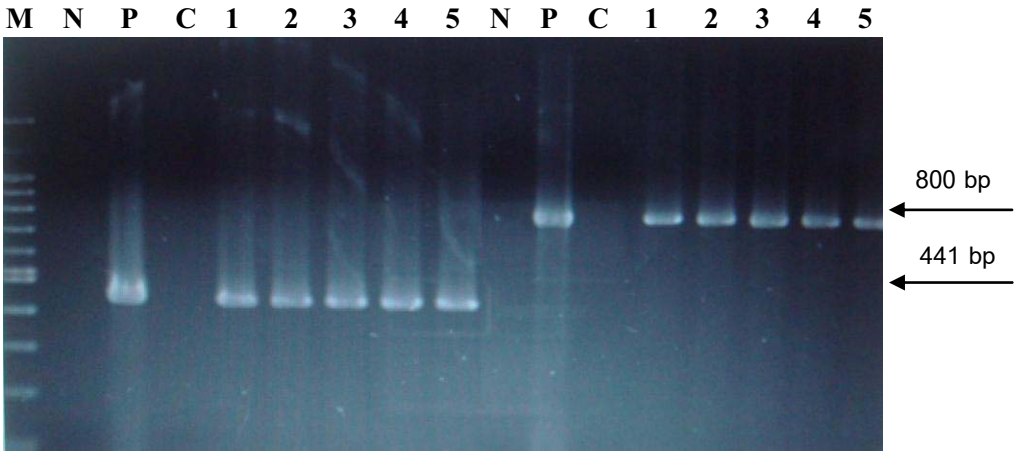
[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน 168 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 0.63 เซนติเมตร)

ก: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 168 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 การตรวจสอบยีน *gus* (441 คู่เบส) และ *hpt* (800 คู่เบส) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีนที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส P: positive control C: ตัวอย่างที่ไม่ได้รับยิงยีน

1: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

2: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5: เพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

6. ผลของชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมต่อการถ่ายยีน

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหาร ที่เติม น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ น้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และน้ำตาลแมนนิทอลร่วมกับน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ก่อนการยิงยีน และหลังการยิงยีน จากนั้นนำเอ็มบริโอเ จนิคแคลลัสที่ยิงยีนมาเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยี น *gus* ด้วย histochemical method พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาล แมนนิทอ ล และน้ำตาลซอร์บิทอลร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอล ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* เพิ่มขึ้น โดยอาหารที่เติมซอร์บิทอลร่วมกับแมนนิทอล ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงกว่า การเติมน้ำตาลแมนนิทอล และซอร์บิทอล และอาหารที่เติมน้ำตาลแมนเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 43.42% รองลงมา คือ ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และซอร์บิทอลร่วมกับแมนนิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ให้การแสดงออกของยีน *gus* 39.56% และ 39.33% ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) ลักษณะการติดสีน้ำเงินของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสคล้ายกับการติดสีน้ำเงินในการทดลอง ที่ผ่านมา หลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอ าหารคัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การต้านทาน สูงสุด 82.50% ในอาหารเติมน้ำตาล ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์ รองลงมา คือ ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์ และ แมนนิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้แคสลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน 80% และ 75% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7) จากการศึกษาพบว่า ชนิด และระดับความเข้มข้นของสารออสโมติคัม มีผลต่อเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน แตกต่าง กันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางภาคผนวกที่ 4) และพบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ เช่นเดียวกับการทดลอง ที่ผ่านมา ส่วนการตรวจสอบยี น *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการคัดเลือก พบว่า ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ ของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายไม่ปรากฏ ดีเอ็นเอ ของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 11ก และ ข) โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคบนอาหาร เติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์แคลลั สที่ต้านทาน ไฮโกรมัยซินไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการเติมซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์ แต่ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด ดังนั้น จึงเลือก อาหารที่เติมน้ำตาล แมนนิทอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีนเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

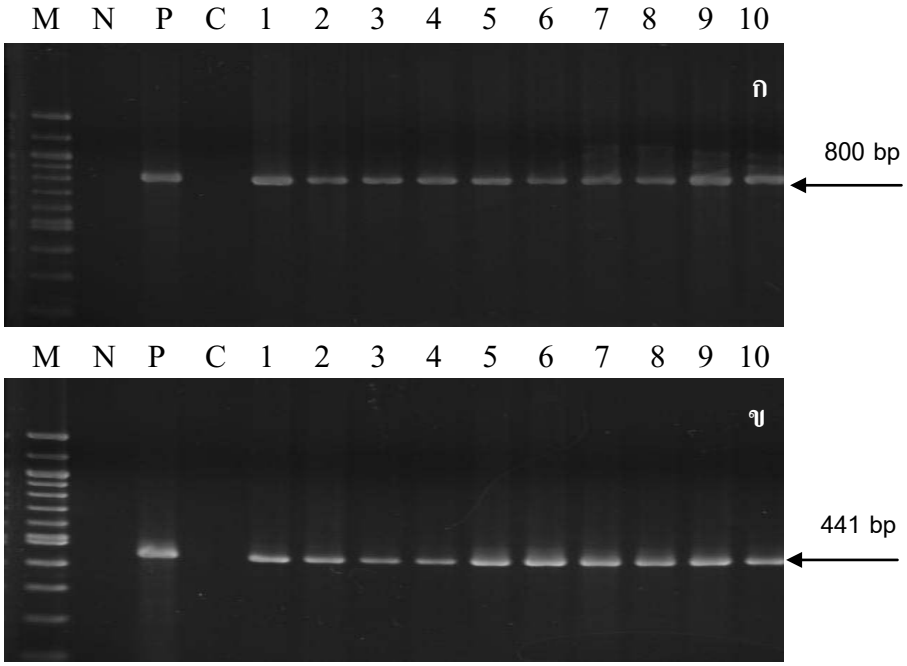
ความเข้มข้นของสารออสโมติคัม (โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus*		
	ชนิดของออสโมติคัม		
	ซอร์บิทอล	แมนนิทอล	ซอร์บิทอล +แมนนิทอล
0.1	25.25b	43.42a	38.78ab
0.3	38.43ab	30.17ab	39.33a
0.5	39.56a	34.51ab	35.65ab
C.V.(%)		21.41	

ตารางที่ 7 ผลของชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของออสโมติคัม (โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน			
	ชนิดของออสโมติคัม			
	ซอร์บิทอล	แมนนิทอล	ซอร์บิทอล +แมนนิทอล	ค่าเฉลี่ย[2] $_{\text{ความเข้มข้น}}$
0.1	82.50a	75.00abc	68.33bc	75.28A
0.3	80.00ab	70.00abc	65.00c	71.67A
0.5	73.33abc	65.00c	51.67d	63.33B
ค่าเฉลี่ย[1] $_{\text{ชนิด}}$	78.61A	70.00B	61.67C	ns
C.V.(%)		10.30		

ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

[1, 2] เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก) ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 การตรวจสอบยีน *gus* (ก) และ *hpt* (ข) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมชนิด และความเข้มข้นของออสโมติคัมที่แตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (N) negative control

P: positive control (C) ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยิงยีน

1: ไม่เติมทั้งซอร์บิทอล และแมนนิทอล

2: เติมน้ำตาลซอร์บอทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์

3: เติมน้ำตาลซอร์บอทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์

4: เติมน้ำตาลซอร์บอทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์

5: เติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์

6: เติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์

7: เติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์

8: เติมน้ำตาลซอร์บอทอลร่วมกับแมนนินอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์

9: เติมน้ำตาลซอร์บอทอลร่วมกับแมนนินอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์

10: เติมน้ำตาลซอร์บอทอลร่วมกับแมนนินอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์

7. ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก

จากการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการยิงยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเวลา 0 3 7 15 และ 24 วัน ก่อนการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน แล้วเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 26 วัน สุ่มชิ้นส่วนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย histochemical method พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิค แคลลัสบนอาหารปราศจากสาร ออสโมติคัม เป็นเวลา 24 วัน ให้การแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด คือ 29.68% รองลงมา คือ ระยะเวลา 15 7 3 และ 0 วัน ให้การแสดงออกของยีน คือ 28.06% 27.55% 25.82% และ 15.14% ตามลำดับ แตกต่าง กันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8) และการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารปราศจากสาร ออสโมติคัม ที่นานขึ้น ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากการวางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส บนอาหารปราศจากสาร ออสโมติคัม เป็นเวลา 7 วัน ให้การต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 92.5% รองลงมา คือ ที่ระยะเวลา 15 24 3 และ 0 ชั่วโมง ให้การต้านทานไฮโกรมัยซิน 90.83% 90.83% 65% และ 30% ตามลำดับ แตกต่าง กันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็ม บริโอเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการคัดเลือก พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และยีน *hpt* ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ในตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏดีเอ็นเอ ของยีนดังกล่าว (ภาพที่ 12ก และ ข) โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็น เวลา 24 วัน ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซินที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะเวลา 7 วัน แต่ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้การเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 24 วัน ในการทดลองต่อไปในอนาคต

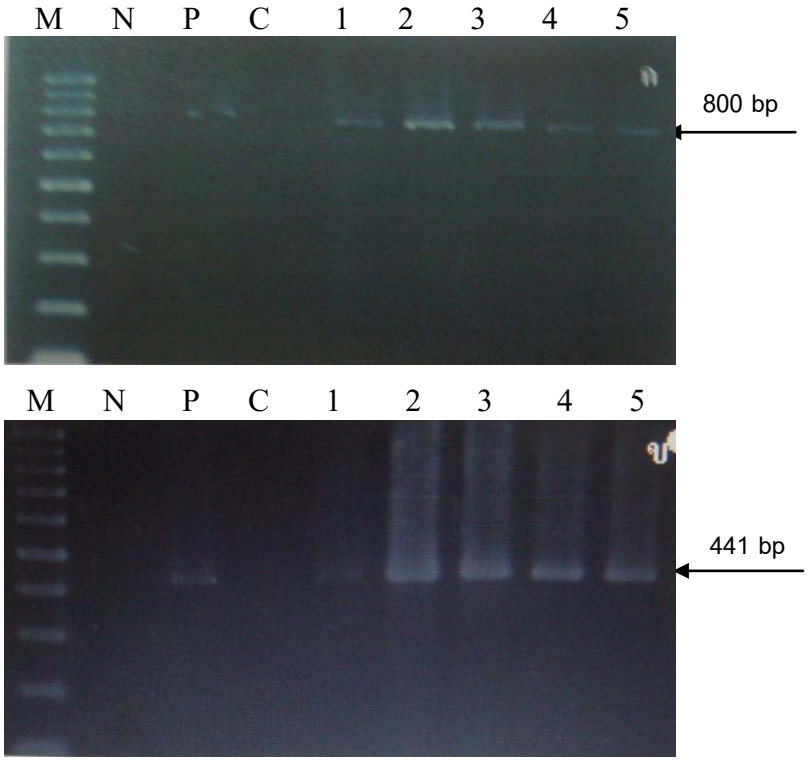
ตารางที่ 8 ผลของระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัม ก่อนการคัดเลือกต่อเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* และเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก (วัน)	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* [1/]	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน
0	15.14b	30.00c
3	25.82ab	65.00b
7	27.55a	92.50a
15	28.06a	90.83a
24	29.68a	90.83a
F-test	*	*
C.V. (%)	23.75	8.107

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

[1/] เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* หลังการยิงยีน 24 วัน



ภาพที่ 12 การตรวจสอบยีน *gus* (ก) และ *hpt* (ข) ด้วยเทคนิค PCR ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน ที่ผ่านการยิงยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยการใช้ระยะเวลาในเพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัม ก่อนการคัดเลือกที่ระยะเวลาแตกต่างกัน หลังจากการยิงยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส N: negative control

P: positive control C: ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการยิงยีน

1: เพาะเลี้ยงบนอาหาร เป็นเวลา 0 ชั่วโมง

2: เพาะเลี้ยงบนอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3: เพาะเลี้ยงบนอาหาร เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

4: เพาะเลี้ยงบนอาหาร เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

5: เพาะเลี้ยงบนอาหาร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 4

วิจารณ์

ความสำเร็จในการถ่ายยีน อย่างมีประสิทธิภาพเข้าสู่เอ็มบริโอ เจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องยิงอนุภาค ต้องอาศัยปัจจัย และวิธีการที่เหมาะสมในการยิง ยีน เช่น แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย แรงดัน สูญญากาศ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ออสโมติคัม ก่อน และหลังการยิงยีน ชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัม และระยะเวลาเพาะเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก เป็นต้น

ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เนื่องจากเซลล์พืชแต่ละชนิดจะใช้ระดับแรงก๊าซฮีเลี่ยมที่เหมาะสมแตกต่างกัน (Kikkent, 1993) ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ต่ำ มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทะลุทะลวงที่ต่ำ ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *gus* ต่ำ อย่างไรก็ตามแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่สูงเกินไปจะไปเพิ่มแรงในการทะลุทะลวง ทำให้ เซลล์เกิดความเสียหาย (Janna *et al*., 2006) พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ และ แต่ละชิ้นส่วน ใช้ระดับแรงดันก๊าซที่เหมาะสมต่างกัน พืชบางชนิดการที่ใช้ระดับแรงก๊าซที่สูง (≥1,300 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีน เช่น แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม 2 สายพันธุ์ (*Dendrobrium* Madame Thong-In และ *Dendrobrium* Chao Praya Smile) ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้การแสดงออกยีนสูงสุดในทั้งสองสายพันธุ์ (Chai *et al.,* 2007) เอ็มบริโอที่มาจากไมโครสปอร์ของข้าวสาลี ใช้ระดับแรงดันก๊าซที่ 1,300 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Ingram *et al.,* 1999) การศึกษาส่วนใหญ่แล้วนิยมใช้ระดับแรงก๊าซที่ระดับกลาง (ประมาณ 900-1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช เช่น เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของมะกอก ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 900 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Barranco *et al.,* 2009) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัม สภาวะที่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด คือ ที่ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Mousavi *et al.,* 2009) และโปรโตคอร์มของกล้วยสกุลหวาย (*Dendrobium* Jacquelyn Thomas) ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ 1,087 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Suwanaketchanatit *et al.,* 2007) แต่พืชบางชนิดการใช้ระดับแรงดันก๊าซต่ำ (≤650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ก็สามารถให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง เช่น แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Sonia 17) ที่มีลักษณะรูปกลม และมีสีเหลืองใส ซึ่งเป็นแคลลัสแบบร่วน ทำการยิงยีนโดยใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 650 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้การแสดงออกของยีน *gus* และ *gfp* สูงสุด (Tee and Maziah,

2005) ในกรณีการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค ส่วนใหญ่แล้วจะใช้ที่แรงดันก๊าซ ระดับกลางที่ ประมาณ 900-1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนที่ใช้แตกต่างกัน ก็ให้ผลการแสดงออกที่แตกต่างกัน ดังการรายงานของ Abdullah และคณะ (2005) และ Lee และคณะ (2006) ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่ 900 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในการถ่ายยีนเ ข้าสู่ไซโกติกเอ็มบริโอที่ไม่สุกแก่ของปาล์มน้ำมัน ในขณะที่ Chowdhury และคณะ (1997) ใช้ระดับแรงดันก๊าซ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในการ ถ่ายยีนเข้าสู่ เอ็มบริโอ เจนิคแคลลัส และใบอ่อนของปาล์มน้ำมันสอดคล้องกับ Parveez และคณะ (1997) ที่รายงานว่า ระดับแรงดันก๊าซฮี เลี่ยม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เหมาะสมต่อ การถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิ คแคลลัส ปาล์มน้ำมัน สำหรับการศึกษานี้ พบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซ 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือ 71.115 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงสุด ซึ่งระดับ แรงดันก๊าซนี้เป็นระดับแรงดันก๊าซที่ต่ำมาก ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลโดยตรงมาจากเครื่องยิงอนุภาคที่แตกต่างกัน ในการ ศึกษานี้ใช้เครื่องที่ประกอบโดย Akashi และคณะ (2002) ในขณะที่การศึกษาข้างต้นใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He (Bio-Rad gun) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Gondo และคณะ (2009) และ Himura และคณะ (2009) ที่ใช้เครื่องยิงอนุภา คที่ใช้เป็นเครื่องชนิดเดียวกันในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคของหญ้าโร้ดส์ และหญ้าบาเฮีย ตามลำดับ พบว่า ที่ระดับแรงดันก๊าซ 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ส่งเสริมป ระสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด และ ในการศึกษานี้ยังพบว่า การใช้ระดับแรงดันก๊าซที่สูง หรือระดับแรงดันก๊าซต่ำ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง โดยเฉพาะการใช้ระดับแรงดันที่สูง 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (99.55 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) มีการแสดงออกที่สูงแต่เนื้อเยื่อได้รับการเสียหายมาก เซลล์มีลักษณะอวบน้ำ และมีสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้นในการศึกษานี้ การ ใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นระดับแรงดันก๊าซที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายมีผลต่อประสิทธิภ าพการถ่ายยีน เนื่องจากเซลล์พืชแต่ละชนิด แต่ละชิ้นส่วน และพันธุ์ที่แตกต่างกัน จึงใช้ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ เหมาะสม ต่างกัน ระยะทาง ระหว่างเนื้อเยื่อเป้าหมาย ที่ใกล้กับหัวกระสุนมาก ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* น้อยที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากอนุภาคเข้าไปในเซลล์ลึกมาก จนอาจทะลุเซลล์ไม่มียีนดังกล่าวในเซลล์เป้าหมายจึงไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* และเนื้อเยื่อจะได้รับแรงดันที่มากทำให้เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายมาก ส่วนระยะห่างที่ไกลออกไปทำให้อนุภาคส่งไปไม่ถึงเนื้อเยื่อ หรืออาจเกิดจากการระดับแรงดันที่น้อยไม่เพียงพอที่จะทะลุผ่านเข้าไปในเซลล์เนื้อเยื่อได้ (Nan and Kuehnle, 1995) พืชบางชนิดการใช้ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเป้าหมายที่ใกล้ (≤7.5 เซนติเมตร) สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีน ได้ เช่น

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของมะกอก ใช้ระยะห่าง 6 เซนติเมตร (Barranco *et al.,* 2009) ที่ระยะห่างนี้ให้ผลเช่นเดียวกันกับในกล้วยที่ใช้ส่วนของลำต้นที่หั่นเป็นชิ้น (corm slices) (Sreeramanan *et al.,* 2005) และเซลล์ซัสเพนชั่นของแพงพวย (*C. roseus*) (Guirimand *et al.,* 2009) การศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้ระยะห่างระหว่างหัวก ระสุนกับเนื้อเป้าหมายที่ ประมาณ 9-10 เซนติเมตร เช่น แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Sonia 17) ที่มีลักษณะรูปกลม และสีเหลืองใส ซึ่งเป็นแคลลัสแบบร่วน (Tee and Maziah, 2005) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของ อินทผาลัม (Mousavi *et al.,* 2009) แคลลัสของกล้วยไม้สกุลหวาย (Chai *et al.,* 2007) และ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ (*Dendrobium sabi*) (พรสุข, 2543) ในกรณีศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่ องยิงอนุภาค ส่วนใหญ่จะ กำหนด ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายประมา ณ 6-7.5 เซนติเมตร ดังการรายงานของ Lee และคณะ (2006) กำหนดระยะห่าง ระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 เซนติเมตร ในการ ถ่ายยีนเข้าสู่ เอ็มบริโอที่ไม่สุกแก่ของปาล์มน้ำมัน ส่วน Parveez และคณะ (1997) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำ มัน พบว่า ที่ระยะห่าง 7.5 เซนติเมตร ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด สอดคล้องกับ Chowdhury และคณะ (1997) กำหนดระยะห่าง 7.5 เซนติเมตร ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ในขณะที่การศึกษานี้ พบว่า ที่ระยะห่าง 10 เซนติเมตร ให้ผล การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงสุด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเครื่องยิงอนุภาค และพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ใช้แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นชิ้นส่วนชนิดเดียวกัน แต่พันธุ์ที่แตกต่างกัน ก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพกา รในการถ่ายยีนที่แตกต่างกันได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาขอ ง Gondo และคณะ (2009) ใช้เครื่องยิงอนุภาคที่ใช้เป็นเครื่องชนิดเดียวกัน ใช้ระยะห่าง 9.6 เซนติเมตร ในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้าโร้ดส์ ในการศึกษานี้ได้ปรับระยะห่างให้เป็น 10 เซนติเมตร เนื่องจากการศึกษาระยะที่ใกล้กับหัวกระสุน 3.4 เซนติเมตร เกิดการกระจายของวุ้น และเนื้อเยื่อ จึงได้ดัดแปลงวิธีการวางโดยการวางเนื้อเยื่อดังกล่าวบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และเพิ่มความหนาของกระดาษเพื่อลดการกระแทก นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ระยะที่ใกล้ หรือไกลกับหัวกระสุนมาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง โดยเฉพาะการใช้ระยะห่าง 3.4 เซนติเมตร ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอวบน้ำ สีน้ำตาลเข้ม และอาหารสีน้ำตาล ดังนั้นที่ระยะห่าง ระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 10 เซนติเมตร เป็นระยะห่างที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

แรงดัน สุญญากาศ ภายในตู้มี ความสำคัญต่อ ประสิทธิภาพการถ่ายยีน แรงดันสูญญากาศภายในตู้มีผลต่อความเร็วของอนุภาคโลหะ และการทะลุทะลวง เข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย เนื่องจากอนุภาคโลหะมีขนาดเล็ก และน้ำหนักเบา เมื่ออนุภาคโลหะวิ่งผ่านอากาศ ทำให้ความเร็ว

ลดลง เพราะมีแรงต้านของอากาศ หรือแรงเสียดทานภายในตู้ เมื่อทำการดูดอากาศภายในตู้ออกเกิดเป็นสภาวะสูญญากาศ อนุภาคโลหะสามารถพุ่งด้วยความเร็วขึ้น ทำให้อนุภาคที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอพุ่งใส่เนื้อเยื่อเป้าหมาย และแต่ละทะลุเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ทำให้มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้น (Sanford *et al*., 1993) พืชแต่ละชนิด แต่ละชิ้นส่วน และพันธุ์ใช้ระดับแรงดันสูญญากาศเหมาะสมที่แตกต่างกัน พืชบางชนิดต้องการแรงดันสุญญากาศที่ต่ำ (≤26 นิ้วของปรอท) เช่น เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัม (Mousavi *et al.,* 2009) ส่วนของลำต้นที่หั่นเป็นชิ้นของกล้วย (Seeeramanan *et al.,*2005) และเอ็มบริโอที่มาจากไมโครสปอร์ของข้าวสาลี (Ingram *et al.,* 1999) ส่วนใหญ่แล้วระดับแรงดัน สูญญากาศที่นิยมใช้ คือ 27-28 นิ้วของปรอท เช่น เซลล์ซัสเพนชั่นของแพงพวย (*C. roseus*) (Guirimand *et al.,* 2009) และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน (Parveez *et al.,* 1997) ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า ระดับแรงดันสุญญากาศภายในตู้ลดลง -0.1 เมกะปาสคาล หรือ 29.53 นิ้วของปรอท ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด ถึงแม้ว่าจะเป็นชิ้นส่วนชนิดเดียวกัน แต่พันธุ์ที่แตกต่างกัน และการเครื่องยิงอนุภาคที่แตกต่างกันก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพการในการถ่ายยีนที่ได้แตกต่างกัน ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Gondo และคณะ (2009) ที่ใช้ระดับแรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคของหญ้าโร้ดส์ เนื่องเครื่องยิงอนุภาคที่ใช้เป็นเครื่องชนิดเดียวกัน ดังนั้นการใช้ระดับแรงดัน สูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล เป็นระดับแรงดันสุญญากาศที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน

สภาพออสโมติกของเซลล์พืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีควา มสำคัญต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เนื่องจาก กระบวนการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิ งอนุภาคต้องอาศัยความเร็วสูงในการขับดั น อนุภาคโลหะให้ทะลุผ่านเข้าไปในเซลล์พืช ซึ่งกระบวนการส่งผ่านนี้อาจมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย และมีการสะสมของก๊าซเอทิลีน (Imaseki, 1986) การปรับระดับออสโมติกภายในเซลล์เป็นการปรับ กระบวนการ ออสโมซิส เมื่อแรงดันออสโมติ กภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์จะทำให้น้ำภายในเซลล์เ คลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาภายนอก เยื่อหุ้มเซลล์มีความคงตัวเมื่อได้แรงดัน และ ลดแรงเต่งของเซลล์ ช่วยใน การลดการรั่ว และการแตกของเซลล์ (Perl *et al.,* 1992; Ye *et al.,* 1994) ในทางตรงกั นข้ามเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่มีระดั บแรงดันออสโมติกที่ต่ำกว่าจะทำให้น้ำภายนอกเซลล์เคลื่อนผ่านเ ยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ เป็นผลทำให้เซลล์เต่ง หรือเซลล์อวบน้ำ ดังนั้นการปรับระดับออสโมติกมีส่วนสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน และการพัฒนาของเซ ลล์ โดยทั่วไปการปรับแรงดันออสโมติก ด้วยการเติมสารละลายออสโมติคัม นิยมใช้สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น น้ำตาลแมนนิทอล หรือน้ำตาลซอร์บิทอล เนื่องจากไม่มีผลต่อการบวนกา รเมทาบอลิซึมของเซลล์ ทำให้เซลล์มีคุณสมบัติคงตัว นอกจากนี้ระยะเวลาในการวางเลี้ยงบนออสโมติคัมก่อน และหลังการยิงยีน มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน

เช่นกัน Mousavi และคณะ (2009) ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัมบนอาหารเติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน และหลังจากการยิงยีน วางเลี้ยงบนอาหา รดังกล่าวต่ออีก เป็นระยะเวลา 4 วัน สอดคล้องกับ Romano *et al.,* 2005 ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงใบของมันฝรั่งบนอาหารเติมน้ำตาลแมนนิทอล ร่วมกับซอร์บิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการยิงยีน และหลังการยิงยีน ในขณะที่ Gondo และคณะ (2009) ศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคของหญ้าโร้ดส์ (*C. gayana*) บนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 1.2 โมลาร์ ก่อนการถ่ายยีน พบว่า ระยะเวลา 7 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพออสโมติก ของเนื้อเยื่อ ในกรณีของปาล์มน้ำมันนั้น Parveez และคณะ (1998) รายงานว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปยิงยีน และ วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมต่อ หลังจากยิงยีนเป็นระยะเวลา 0-6 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพออสโมติก ในการปรับสภาพออสโมติกเอ็มบริโอเจนิคของปาล์มน้ำมัน ในการศึกษานี้ ทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคของปาล์มน้ำมันบนอาหาร ที่เติมน้ำตาล ทั้งสองชนิด คือ แมนนิทอล และซอร์บิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.3 โมลาร์ ทั้งก่อนการยิงยีน และหลัง การยิงยีน พบว่า การปรับสภาพด้วยสารออสโมติคัม ส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* เพิ่มขึ้น และพบว่า ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และหลังการยิงยีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน เนื่องมาจากพันธุ์ที่ใช้ ในการศึกษา และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่แตกต่างกัน ส่งผลให้การใช้ระยะเวลาในการปรับ ออสโมติคัมต่างกัน ในขณะที่การศึกษานี้ ยังพบว่า การเพาะเลี้ยง บนอาหารออสโมติคัมที่ระยะเวลาที่สั้น หรือนานเกินไป ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง โดยเฉพาะการใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอาหารออสโมติคัมที่นานเกิน คือ ที่ระยะเวลา 72 และ 168 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ที่ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระยะเวลา 168 ชั่วโมง สามารถสังเกตเห็นสีของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีลักษณะเซลล์ที่เป็นสีน้ำตาลเข้ม และมีการปล่อยสารบางชนิดที่ทำให้อาหารเป็นสีเป็นสีน้ำตาล และไม่มีการตอบสนองต่อการต้าน ไฮโกรมัยซิน

ชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัม มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน สารออสโมติคัมที่ใช้ในการปรับสภาพออสโมติกในเซลล์พืชอาจใช้เพียงชนิดเดียว หรือสองชนิดควบคู่กัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษา Ribas และคณะ (2005) สามารถปรับสภาพออสโมติคัมเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของกาแฟ โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอลเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทำนองเดียวกับ Mousavi และคณะ (2009) ใช้น้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในการปรับออสโมติกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัม ในขณะที่พืชบางชนิดต้อง

การสารออสโมติคัมสองชนิด เช่น Chernobrovkina และคณะ (2007) ใช้น้ำตาลแมนนิทอล และซอร์บิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.4 โมลาร์ ใน การปรับสภาพออสโมติก คัมคัพภะที่ไม่สุกแก่ของข้าวบาร์เล่ย์ก่อนนำไปยิงยีน ในการปรับสภาพออสโมติกเอ็มบริโอเจนิคของปาล์มน้ำมัน นั้น Parveez และคณะ (1998) ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัม พบว่า น้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ เพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน *gus* รองลงมาคือ น้ำตาลซอร์บิทอลร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้นอย่างละ 0.3 โมลาร์ ในขณะที่การศึกษานี้ พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ซึ่งเป็นระดับเข้มข้นที่ ต่ำเมื่อเทียบกับการศึกษาข้างต้น อย่างไรก็ตามในพืชหลายชนิด มีรายงาน การใช้ความเข้มข้น ของออสโมติคัมที่ต่ำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีน เช่น Purkayastha และคณะ (2010) ศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคัมที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กลุ่มของปลายยอด ของสบู่ดำ พบว่า น้ำตาลแมนนิทอล ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ส่งการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ในขณะที่ Yu และคณะ (1999) รายงานว่า ทำการปรับสภาพออสโมติ กโดยใช้น้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 0.25 โมลาร์ ในโปรโตคอร์มของกล้วยสกุลหวายลูกผสม (*Dendrobuim hybrid* 'MiHua') ก่อนการยิงยีน ให้ผลการแสดงออกของยีนสูงสุด แสดงให้เห็นว่า พืชแต่ละชนิด ชิ้นส่วน และพันธุ์ของพืชมีการตอบสอบต่อช นิด และความเข้มข้นของสารออสโมติคั มที่ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้การตอบสนองของเซลล์ที่แตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการยิงยีนบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก เป็นการยืดร ะยะเวลาก่อนที่เนื้อเยื่อจะถูกคัดเลือกบนอาหารเติม สารปฏิชีวนะ เพื่อให้เนื้อเยื่อที่ผ่านการยิง มีการซ่อมแซม บาดแผลที่เกิดกับ เซลล์ และคืนสภาพเซลล์ให้เกือบเป็นปกติก่อนการคัดเลือก (Gondo *et al.,* 2009) Purkayastha และคณะ (2010) เพาะเลี้ยงกลุ่มของยอดสบู่ดำที่ผ่าน การยิงยีนบนอาหารปราศจาก สารปฏิชีวนะคัดเลือก เป็นเวลา 2 วัน ก่อนเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะคานามัยซิน ในขณะที่ Romano และคณะ (2001) ใช้ระยะเวลา 1 วัน ในการเพาะเลี้ยงใบของมันฝรั่งที่ผ่านการยิงยีนบนอาหารปราศจากส ารออสโม ติคัม ก่อนทำการคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ คานามัย ซิน อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ พบว่า ที่ระยะเวลา 24 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารปราศจากสารปฏิชีวนะคัดเลือกนานขึ้น ส่งเสริมการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีกว่า สอดคล้องกับ Franklin และคณะ (2007) และ Gondo และคณะ (2009) ซึ่งรายงาน การใช้ชิ้นส่วนของ Organogenic nodules ของ *H. perforatum* L. และเอ็มบริโอเจนิค แคลลัสของหญ้าโร้ดส์ ตามลำดับ ว่าใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำพืชต้นใหม่ เป็นเวลา 45 วัน (Organogenic nodules) และระยะเวลา 15 วัน (เอ็มบริโอเจนิค แคลลัส) ก่อนการคัดเลือก บนสาร

ปฏิชีวนะคัดเลือก ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก การใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการยิงบนอาหารที่ปราศจาก สารปฏิชีวนะคัดเลือก ที่นานขึ้น ส่งผลให้เซลล์พืชสามารถปรับสภาพหลังจากการถูกยิง และสามารถพัฒนาเป็นพืช ต้นใหม่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือกก็มีผลต่อความสำเร็จในการถ่ายยีนเช่นกัน เนื่องการใช้ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่สูงมาก มีผลต่อการยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อหลังการ เพาะเลี้ยง ดังนั้น การนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการยิงยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นต่ำในครั้งแรก แล้วทำการย้ายไปเลี้ยงอาหารที่มีระดับความเข้มที่สูงขึ้น จนถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื้อเยื่อสามารถ ที่จะพัฒนาพืชต้นใหม่ ได้เพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Suwanakaketchanatit และคณะ (2007) ศึกษาการถ่ายยีนอย่างมีประสิทธิภาพสูงแบบถาวรในกล้วยไม้สกุลหวา ย *(Dendrobium* Jaquelyn Thomas) โดยการนำโปรโตคอร์มที่ผ่านการยิงยีนมาเพาะเลี้ยง บนอาหารที่ปราศจากสารออสโมติคัม เป็นเว ลา 3 วัน แล้วย้ายไปบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยชิน เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยชิน เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน ก่อนย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยชิน เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน สามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้สมบูรณ์ เมื่อทำการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR และ Southern blot hybridization พบการปรากฏของทั้งยีน *gfp* และยีน *htp* อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการคัดเลือกด้วยวิธีดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควร มีการปรับระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนในปาล์มน้ำมันให้สูงขึ้น

ส่วนการตรวจสอบ โดยการใช้เทคนิค PCR พบการปรากฏ ของยีน *gus* และยีน *hpt* ในจีโนมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน แต่ในตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสอง ทั้งนี้จะต้องมีการติดตาม และตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในระหว่างกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป เพื่อที่จะสามารถยืนยันได้ว่าสามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแค ลลัสปาล์มน้ำมัน และพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่มียีนดังกล่าวสอดแทรกอยู่ในจีโนมได้สำเร็จ

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพ

1. แรงดันก๊าซฮีเลี่ยม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 65.74% และต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 91.67%
2. ระยะห่างระหว่างหัวกระสุนกับเนื้อเยื่อเป้าหมาย 10 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด 62.33% และต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 92.99%
3. แรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสคาล ให้การแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด คือ 66.22% และต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 91.67%

การศึกษาปัจจัยทางเคมี

1. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมก่อนการยิงยีน เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 68.75% และต้านทานไฮโกรมัยซินสูงสุด 95.83%
2. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารออสโมติคัมหลังการยิงยีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 38.63% และให้การต้านทานไฮโกรมัยซิน 70%
3. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.1 ให้การแสดงออกของยีน *gus* 43.42% และให้การต้านทาน ไฮโกรมัยซิน 75%
4. การเพาะเลี้ยงบนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการยิงยีนบนอาหารปราศจากสารออสโมติคัมก่อนการคัดเลือก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด 29.68% และให้การต้านทานไฮโกรมัยซิน 90.83%

การตรวจสอบยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังยิงยีน พบยีนดังกล่าวขนาด 441 คู่เบส และ 800 คู่เบส ตามลำดับ ในจีโนมของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ผ่านการยิงยีน ในตัวอย่างทั้งหมดที่สุ่มมาตรวจสอบ

เอกสารอ้างอิง

เจริญ สิงห์ลอ . 2532. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะของปาล์มน้ำมันเพื่อทวีจำนวนต้นและย่นระยะเวลาในการงอก วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นิจวรรณ สนิทงาม 2545. การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง (*Azadirachta excisa* Jacob). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ และสมเกียรติ สีสนอง. 2548. เส้นทางสู่ความสำเร็จการผลิตปาล์มน้ำมัน. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. คัมภีร์ปาล์มน้ำมันพืชเศรษฐกิจเพื่อบริโภคและอุปโภค. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.

พรสุข ชัยสุข. 2543. การถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้ไทยโดยวิธียิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์นุกุล. 2543. การถ่ายฝากยีน Chymotrypsin Inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล, วินาภรณ์ กุฎีรัตน์ และกิจจารักษ์ วงษ์กุดเลาะ . 2541. ปาล์มน้ำมัน . กรุงเทพฯ : กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 2549. ปาล์มน้ำมัน เนื้อที่ให้ผลผลิต ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ ปี 2547-2549. เข้าถึงได้จาก http://www. it.doa.go.th/palm/pdf/statistics. (เข้าถึงเมื่อ 4/12/2551).

สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2552. ผลของแหล่งชิ้นส่วนต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยการใช้อะโกรแบคทีเรียม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40: 444-447.

อาสลัน หิเล . 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

Akashi, R., C. Yuge, T. Gondo, O. Kawamura and F. Hoffmann. 2002. Bialaphos-resistant cells of dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) through particle bombardment with a simple self-built inflow gun. Grassland Science 47: 588-93.

Barranco, G. P., R. Torreblanca, I. M. G. Padilla, C. S. Romero, F. P. Alfaro and J. A. Mercado. 2009. Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglyciside antibiotics for *npt*II selection; II. Transient transformation via particle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 243-251.

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

Chai, D., S. M. Lee, J. H. Ng, and H. Yu. 2007. L-Methionine sulfoximine as a novel selection agent for genetic transformation of orchids. Biotechnology 131: 466-472.

Chehmalee, S. and S. Te-chato. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. Agricultural Technology 4: 137-146.

Chernobrovkina, M. A., E. A. Sidorov, I. A. Baranov, P. N. Kharchenko and S. V. Dolgov. 2007. The effect of the parameters of biolistic transformation of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) on the level of transient expression of *GFP* reporter gene. Biology Bulletin 34: 558-563.

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

Cui, L. D. 1985. Fertile tetraploid of japonica x indica in rice. Proceeding of the Japan Academy 27: 43-48.

Finer, J. J., P. Vain, M. W. Jones and M. D. McMullen. 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. Plant Cell Reports 11: 323-328.

Franklin, G., M. Oliveira and A. C. P. Dias. 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. Plant Science 172: 1193-1203.

Gondo, T., J. Matsumoto, S. Tsuruta, M. Yoshida, A. Kawakami, F. Terami, M. Ebina, T. Yamada and R. Akashi. 2009. Particle inflow gun-mediated transformation of multiple-shoot clump in Rhodes grass (*Chloris gayana*). Plant Physiology 166: 435–441.

Grewal, D., R. Gill and S. S. Gosal. 2006. Genetic engineering of *Oryza sativa* by particle bombardment. Biologia Plantarum 50: 311-314.

Guirimand, G., V. Burlat, A. Oudin, A. Lanoue, B. S. Pierre and V. Courdavault. 2009. Optimizaton of the transient transformation of *Catharathus roseus* cell by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydromethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. Plant Cell Reports 28: 1215-1234.

Himuro, Y., T. Gondo, K. Yamakawa and R. Akashi. 2009. Genetic transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) by visually screening cell expressing green fluorescent protein. Grassland Science 55: 216-220.

Hussey, G. 1958. An analysis of the factors controlling the germination of the seed of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). American Journal of Botany 22: 259-284.

Imaseki. 1986. Ethlyene. *In* Chemistry of Plant Hormones. (ed. N. Takahashi) pp. 249-264. Boca Raton: CRC press.

Ingram, H. M., J. B. Power, K. C. Lowe and M. R. Davey. 1999. Optimization of procedures for microprojectile bombardment of microspore-derived embryos in wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 207-210.

Janna, O. A., M. Maziah, G. K. A. Parveez and K. Saleh. 2006. Factors affecting gene delivery and transient expression of β-glucuronidase gene in *Dendrobium* Sonia protocormlike-body. Biotechnology 5: 88-94.

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

Kikkent, J. R. 1993. The biolistic PDS-1000/He device. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 221-226.

Kanchanapoom, K. and P. Domyoas. 1999. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. Science Asia 25: 193-200.

Lee, M. P., L. H. Yeun and R. Abdullah. 2006. Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic oil palm. Biotechnology 9: 717-3458.

Liao, L. P., I. C. Pan, Y. L. Chan, Y. H. Hsu, W. H. Chen and M. T. Chan. 2004. Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of Cymbidium Mosaic Virus is a manifestation of RNA-mediated resistance. Molecular Breeding 13: 229-242.

Lioret, C. 1981. Vegetatiave propagation of oil palm by somatic embryogenesis. The Oil Palm in Agriculture in the Eightie (eds. E. Puslparajah and C. P. Soon.) pp. 163-172, Kula Lamper: The In Crop Socity of Planters.

McCabe, D. and P. Christou. 1993. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL™technology). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 227-236.

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

Morikawa, H., A. Iida and Y. Yumada. 1989. Transient expression of foreign gene in plant cells and tissue obtained by a simple biolistic device (particle-gun). Applied Microbiology and Biotechnology 31: 320-322.

Mousavi, M., A. Mousavi, A. A. Habashi and K. Arzani. 2009. Optimization of physical and biological parameters for transient expression of *uid*A gene in embryogenic callus of date plam (*Phoenix dactylifera* L.) via particle bombardment. Biotechnology 8: 3721-3730.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nan, G. L. and A. R. Kuehnle. 1995. Factors affecting gene delivery by particle gun bombardment of *Dendrobium* orchids. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 31: 131-136.

Oard, J. 1993. Development of an airgun device for particle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 247-250.

Parveez, G. K. A., M. K. U. Chowdhury and N. M. Saleh. 1997. Physical parameters affecting transient GUS gene expression in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using the biolistic device. Industrial Crops and Products 6: 41-50.

Parveez, G. K. A., M. K. U. Chowdhury and N. M. Saleh. 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.

Perl, A., H. Kless, A. Blumenthal, G. Galili and E. Galun. 1992. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization if culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures. Molecular and General Genetics 235: 279-284.

Purkayastha, J., T. Sugla, A. Paul, S. K. Solleti, P. Mazumdar, A. Basu, A. Mohommad, Z. Ahmed and L. Sahoo. 2010. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jathropha curcas*. Biologia Plantarum 54: 13-20.

Rabechault, H. and S. Cas. 1974. Recherches sur la culture *in vitro* des embryo (*Elaeis guineensis* Jacq var. *dura* Becc.). Oleagineaux 29: 73-79.

Rajesh, M. K., E. Radha, A. Karus and V. A. Parthasarathy. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus oil palm: the effect of exogenous polyamines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 41-47.

Ribas, A. F., A. K. Kobayashi, L. F. P. Pereira and L. G. E. Viera. 2005. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. Biologia Plantarum 49: 493-497.

Romano, A., K. Raemakers, R. Visser and H. Mooibroek. 2005. Transformation of potato (*Solanum tubersum*) using particle bombardment. Plant Cell Reports 20: 198-204.

Sanford, J. C., T. M. Klein, E. D. Wolf and N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. Particulate Science and Technology 5: 27-37.

Sanford, J. C., F. D. Smith and J. A. Russuel. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymology 217: 483-509.

Sreeramanan, S., M. Maziah, M. P. Abdullah, M. Sariah, R. Xavier and M. F. Nor Aini. 2005. Physical and biological parameters affecting transient GUS and GFP expression in banana via particle bombardment. Molecular Biology and Biotechnology 13: 37-57.

Suwanaketchanatit, C., J. Piluek, S. Peyachoknagul and P. S. Huehne. 2007. High efficiency of stable genetic transformation in *Dendrobium via* microprojectile bombardment. Biologia Plantarum 51: 720-727.

Takeuchi, Y., M. Dotson and N. T. Keen. 1992. Plant transformation: a simple bombardment device based on flowing helium. Plant Molecular Biology 18: 835-839.

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

Te-chato, S. 1998b. Fertile plant from young leaves-derived somatic embryos of oil palm. Songklanakarin Journal Science Technology 20: 7-13.

Te-chato, S. 2002. Improve callus induction and embryogenic callus formation from cultured young leaves of oil palm seedling. Thai Journal Agricultural Science 35: 407-413.

Tee, C. S., M. Maziah, C. S. Tan and N. P. Abdullah. 2003. Evaluation of different promoters driving the GFP report gene and selected target tissue for particle bombardment of *Dendrobium* Sonia 17. Plant Cell Reports 21: 452-458.

Tee, C. S. and M. Maziah. 2005. Optimization of biolistic bombardment parameters for *Dendrobium* Sonia 17 calluses using GFP and GUS as the reporter system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 77-89.

Teixeira, J. B., M. R. Sondahl, T. Nakamura and E. G. Kirby. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 227-233.

Teixeira, J. B., M. R. Sondahl, T. Nakamura and E. G. Kirby. 1995. Establishment of oil palm cell suspension and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 105-111.

Vain, P., M. D. McMullen and J. J. Finer. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. Plant Cell Reports 12: 84-88.

Visarada, K. B. R. S. and N. P. Sarma. 2004. Transformation of indica rice through particle bombardment: factors influencing transient expression and selection. Biologia Plantarum 48: 25-31.

Ye, X., S. K. Brown, R. Scorza, J. Cordts and J. C. Sanford. 1994. Genetic transformation of peach tissues by particle bombardment. Horticultural Science 119: 367-373.

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

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 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
$MnSO_4H_2O$	16.90
$ZnSO_47H_2O$	10.60
$CuSO_45H_2O$	0.025
$NaMoO_42H_2O$	0.25
$CoCl_26H_2O$	0.025
$CaCl_22H_2O$	440.00
$MgSO_47H_2O$	370.00
$FeSO_47H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
ThiamineHCl (B1)	0.10
PyridoxineHCl (B6)	0.50
Glycine	2.00
Sucrose 3%, Agar 0.6-0.7% (0.75%), pH 5.7-5.8	

ตารางภาคผนวกที่ 2 ตารางองค์ประกอบของสูตรอาหาร Luria Bertani (LB)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (ก./ล.)
Bacto tryptone	10
Bacto yeast extract	5
NaCl	5
Agar	7.5
pH	7

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ปริมาตรตามต้องการปิดปากด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการทำให้อาหารแข็งให้เติม agar ลงไปในส่วนผสม 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อนำไ ปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเทอาหารใส่จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร จานละ 20 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 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	

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลของชนิด และความแข้มข้นของสารออสโมติคัมต่อเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานไฮโกรมัย หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
REP	2	28.24074	14.12037	0.27^{ns}	0.7662
N	2	1292.12962	646.06481	12.39**	0.0006
T	2	675.46296	337.73148	6.48**	0.0087
N*T	4	75.92592	18.98148	0.36^{ns}	0.8306

C.V. (%) = 10.30

N = ชนิดของสารออสโมติคัม T = ระดับความเข้มขันของสาออสโมคัม

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

รายการภาคผนวกที่ 1 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

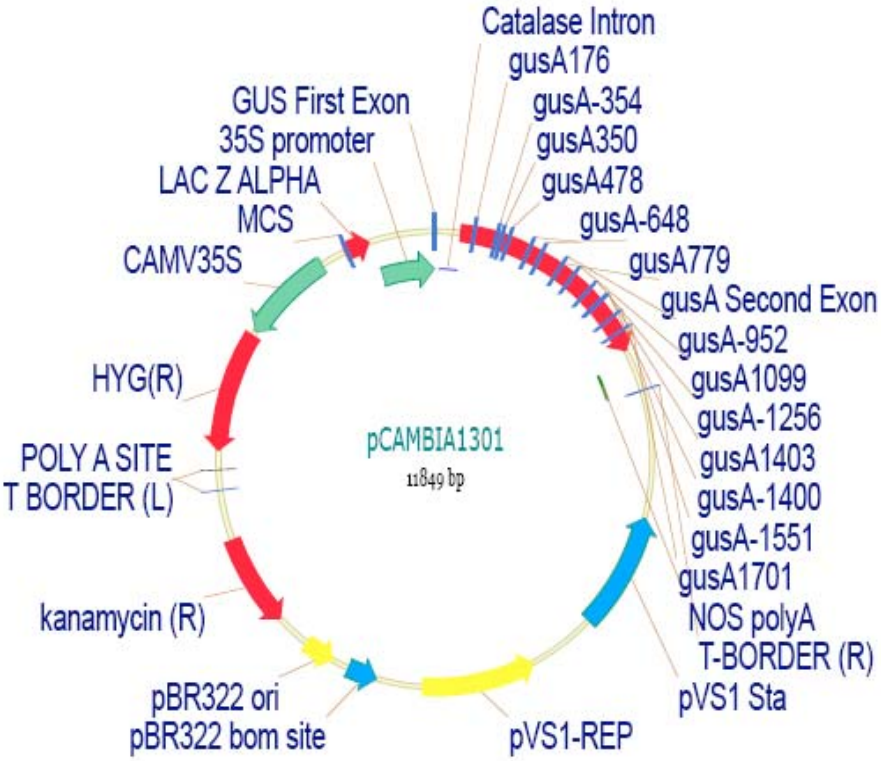
3. Ammonium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ammonium acetate	38.54	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยมิลลิพอร์

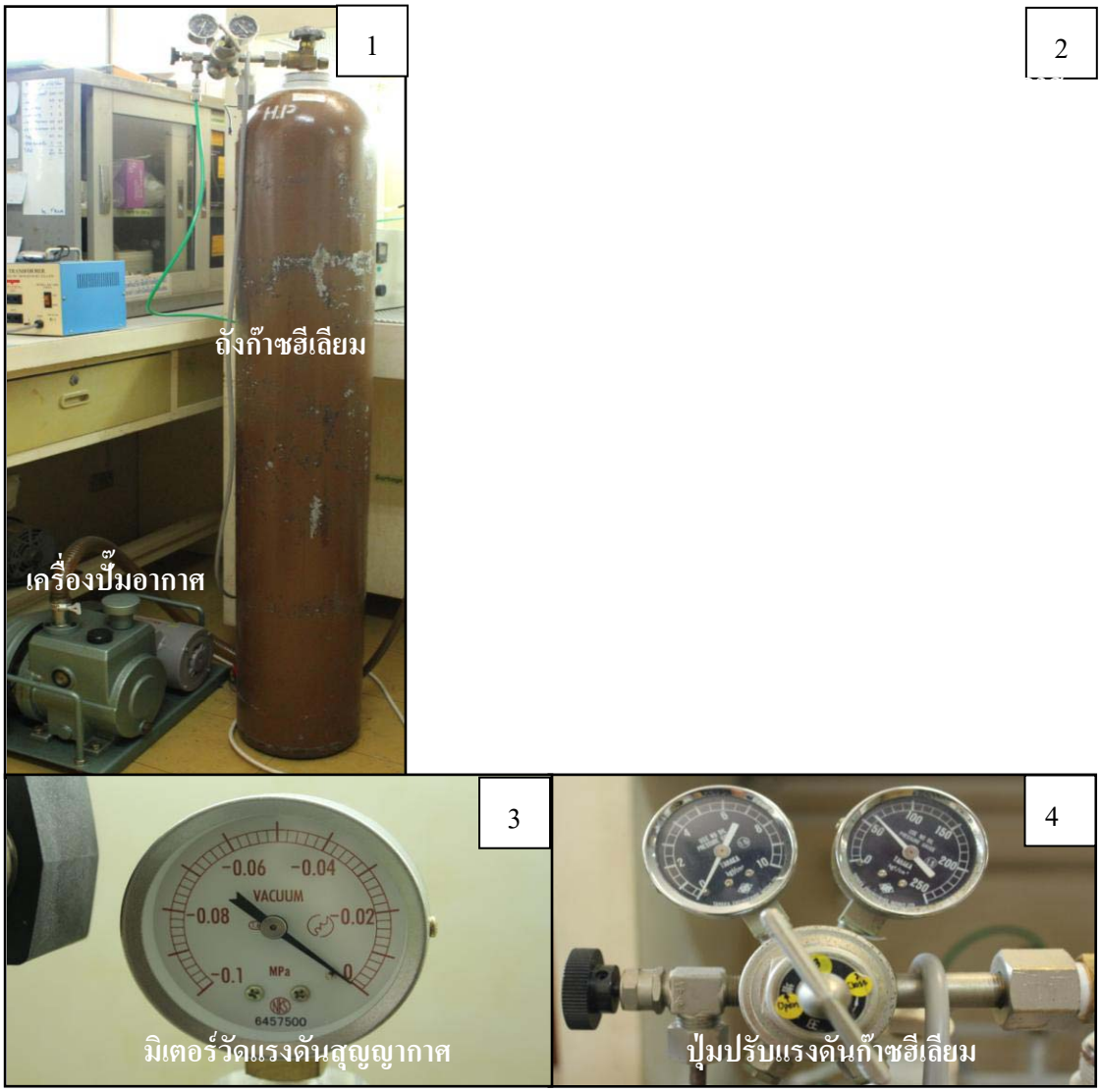
4. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร



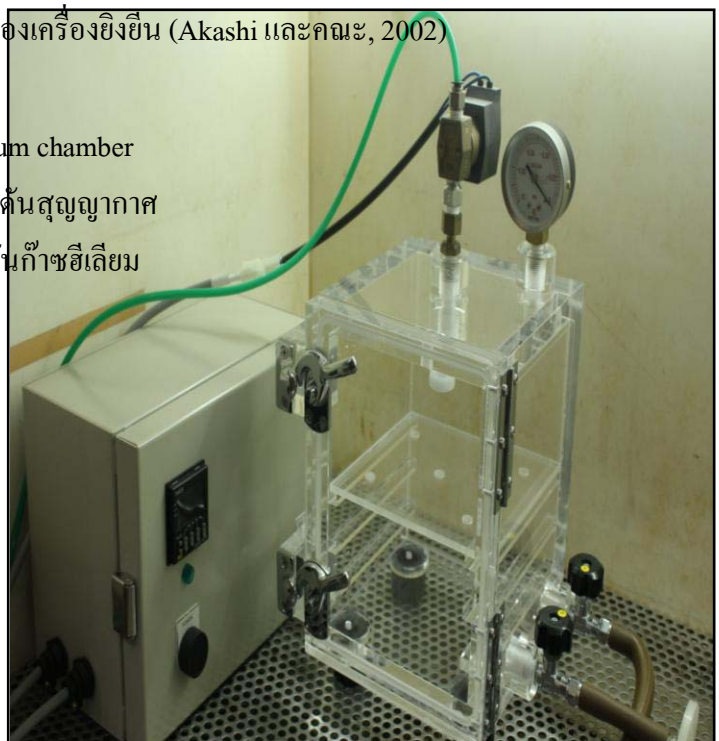
ภาพภาคผนวกที่ 1 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301

ที่มา: CAMBIA, 2006



ภาพภาคผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของเครื่องยิงยืน (Akashi และคณะ, 2002)

1. ถังก๊าซฮีเลียม
2. Acrylic vacuum chamber
3. มิเตอร์วัดแรงดันสุญญากาศ
4. ปุ่มปรับแรงดันก๊าซฮีเลียม



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุนทรียา กาละวงศ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5110620069

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	2551

ทุนการศึกษา

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

สุนทรียา กาละวงศ์ และสมปอง เตชะโต. 2553. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.