ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมัน

Factors effecting on gene transfer in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์[1*], สุภาวดี ถาวโร[1] และสมปอง เตชะโต[2]

Potjamarn Suraninpong[1*], Supawadee Tawaro[1] and Sompong Te-chato[2]

บทคัดย่อ: ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ให้ปริมาณน้ำมันสูง พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ทางภาคใต้ของประเทศไทย การขยายพื้นที่ปลูกไปในภาคต่างๆ จำเป็นต้องหาพันธุ์ที่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคการถ่ายยีน โดยนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ชักนำจากใบอ่อนของต้นที่ให้ผลผลิตสูง มาเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน ผลการศึกษาพบว่า ไฮโกรมัยซิน คานามัยซิน และ ฟอสฟิโนทริซิน ความเข้มข้น 20 200 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เหมาะสมที่จะนำใช้คัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน และซีโฟทาซีม ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่จะนำมาใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ส่วนการศึกษาระยะเวลาการบ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้อ ระยะเวลาและวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อเพื่อตรวจหาการแสดงออกอย่างชั่วคราวของยีน *gus* หลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบ่มร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pCAMBIA 1301 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เลี้ยงร่วมบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบจุดสีน้ำเงิน 8 จุดต่อชิ้นส่วน ดังนั้นสภาวะนี้จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันมากที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอ็มโอเจนิคแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสองบนแผ่นเจล

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, *Agrobacterium tumefaciens*, การถ่ายยีน, เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส, สารปฏิชีวนะ

ABSTRACT: Oil palm is a highly producing oil plant. The most cultivation area is in the southern part of Thailand. Expended area of oil palm in the others part needs suitable variety. Thus, the object of this study was to improvement of oil palm via gene transfer technique. Embryogenic callus inducing from young leaves of high yield oil palm were cultured on various kinds and concentrations of antibiotics for screening of suitable concentration using for gene transformation. The result showed that hygromycin, kanamycin and phosphinotricin at 20, 200 and 5 mg/l, respectively, were suitable for transformed selection. Cefotaxime concentration at 200 mg/l was suitable for killing of agrobacterium. The study of inoculation time, co-culture time and co-culture conditions had done for examination of transient expression of *gus* gene after transformation for 3 days. It was found that embryogenic callus inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pCAMBIA 1301 for 6 h and co-cultured on solid medium for 48 h promoted efficiency of gene transfer, 50% with 8 blue spots/explant. Thus, this condition is the most suitable to use for gene transfer in oil palm. Nevertheless, embryogenic callus that could grow on medium supplemented with hygromycin for 4 weeks, after checking of the *gus* and *hpt* gene using PCR technique showed no band on the gel.
Key words: oil palm, *Agrobacterium tumefaciens*, gene transfer, embryogenic callus, antibiotic

[1] สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161
Institute of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161

[2] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Price of Songkla University, Songkla

* Corresponding author: spotjama@wu.ac.th

บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดในอาณาจักรพืชน้ำมัน คือให้ผลผลิต 2-7 ตันต่อไร่ต่อปี และให้ผลผลิตน้ำมันปาล์มต่อหน่วยพื้นที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกพืชน้ำมันอื่นๆ คือประมาณ 10 เท่าของน้ำมันในถั่วเหลือง ส่งผลให้น้ำมันปาล์มมีราคาถูกกว่า พืชน้ำมันอื่นๆ เช่น ทานตะวัน และ เรปสีด (ธีระ และคณะ, 2546) จากปัญหาราคาน้ำมันดิบที่มีมูลค่าสูงขึ้น ทำให้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ทดแทน ประเทศไทยมีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มโดยการเพิ่มพื้นที่ปลูก และการปลูกต้นกล้าพันธุ์ดี แต่เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ต้องการน้ำและความชื้นในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยจึงจำกัดอยู่เฉพาะในภาคใต้ของประเทศเท่านั้น ในขณะนี้รัฐบาลมีนโยบายที่จะขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันไปทางภาคต่างๆ ของประเทศ ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีความเหมาะสมต่อการปลูกในสภาพดังกล่าว และผลิตต้นกล้าพันธุ์ดีที่ตรงตามสายพันธุ์ให้เพียงพอ เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้องนำพันธุ์ดูร่าสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะเด่น มีกะลาหนาและไม่มีวงเส้นใยรอบเมล็ด มาผสมกับพันธุ์พิสิเฟอร่าพันธุ์แท้ที่มีลักษณะด้อย ไม่มีกะลา แต่มีวงเส้นใยรอบๆ เมล็ด เพื่อให้ได้พันธุ์เทเนอร่าซึ่งเป็นลูกผสมที่มีลักษณะเด่น คือ กะลาบาง มีวงเส้นใยรอบๆ เมล็ด ลักษณะผลใหญ่ ให้ผลผลิตน้ำมันในชั้นของเปลือกและเมล็ดในของผลสูงกว่าพันธุ์ดูร่าและพันธุ์พิสิเฟอร่า ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบัน การผสมระหว่างสองสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (ประมาณร้อยละ 20) ผลผลิตต่อต้นไม่สม่ำเสมอ ทำให้ผลผลิตต่อพื้นที่ไม่สูงเท่าที่ควร และต้องใช้เวลายาวนานในการผลิตลูกผสมเทอเนอร่าที่ดี (กรมวิชาการเกษตร, 2550) จากความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน (Guerra and Handro, 1998; Te-chato, 1998; Aberlene et al., 1999) ทำให้ผู้วิจัยมีแนวความคิดที่จะทำการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันพันธุ์ลูกผสม ที่ให้ผลผลิตสูงด้วยการถ่ายยีน แต่ในการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่พืชในเบื้องต้นต้องทำการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ ที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งนี้การเลือกใช้ชนิดของสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับยีนที่อยู่บนเส้น Transfer-DNA (T-DNA) ที่ต้องการนำเข้าสู่เซลล์พืช สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน คานามัยซิน และฟอสฟิโนทริซิน เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกในกรณีที่บนเส้น T-DNA มียีน hygromycin phosphotransferase (*hpt*) neomycin phosphor-transferase *(nptII*) และ bialaphos resistace gene (*bar*) เป็นองค์ประกอบตามลำดับ ส่วนสารปฏิชีวนะซีโฟทาซินเป็นสารที่นิยมใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืช ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถกำจัดเชื้อได้ และไม่ทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับความเสียหาย นอกจากนี้ต้องศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีน ซึ่งเมื่อได้วิธีการที่เหมาะสมแล้วจะทำการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่ปาล์มน้ำมันเพื่อการปรับปรุงลักษณะที่ต้องการต่อไป

วิธีการศึกษา

การตอบสนองของเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสปาล์มน้ำมันต่อสารปฏิชีวนะ

นำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทอเนร่าซึ่งชักนำจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันต้นโตที่ให้ผลผลิตสูงอายุ 7-9 ปี จากสถานีวิจัยเทพา อ.เทพา จ.สงขลา ตามวิธีของ Te-chato et al. (2002) อายุ 6 เดือน มาวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 0 50 80 100 150 แล 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟินโนทริซิน 0 5 10 20 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซีโฟทาซิม 0 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (Figure 1) เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกความมีชีวิตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง

บนอาหารดังกล่าวทุก ๆ สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 แคลลัสต่อจานเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาการบ่มเชื้อ วิธีการเลี้ยงร่วม และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

นำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสปาล์มน้ำมันมาบ่ม (Inoculation) ร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pCAMBIA 1301 ที่มียีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือกในพืช และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ในอาหารที่เติมอะซีโตไซริงกอน 200 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 4 6 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (Co-culture) ด้วยวิธีวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง และ วางเลี้ยงบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้กระดาษกรองชื้นด้วยการหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้ง 2 วิธี ทำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้น MS (Murashige and Skoog, 1962) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และกรดแอสคอร์บิค 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) เติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ แต่ละหน่วยทดลองใช้เอ็มบริโอเจนนิกแคลลัสจำนวน 30 ชิ้น ตรวจสอบความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารคัดเลือกทุกสัปดาห์ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว ด้วยวิธี histochemical assay ตามวิธีของ Jefferson et al. (1987) หลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบการมีอยู่อย่างถาวรของยีน *gus* และยีน *hpt* โดยใช้เทคนิค PCR หลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ การสกัดดีเอ็นเอทำตามวิธีการของ ของ Doyle and Doyle (1990) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน hpt คือ 5′-CCTGAACTCACCGCGACG-3′ และ 5′-AAGAC-CAATGCGGAGCATATA-3′ ซึ่งให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน gus คือ 5′-CTGCGACGCTCACACCGATAC-3′ และ 5′-TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3′ ซึ่งให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 441 คู่เบส (กาญจนา, 2551)

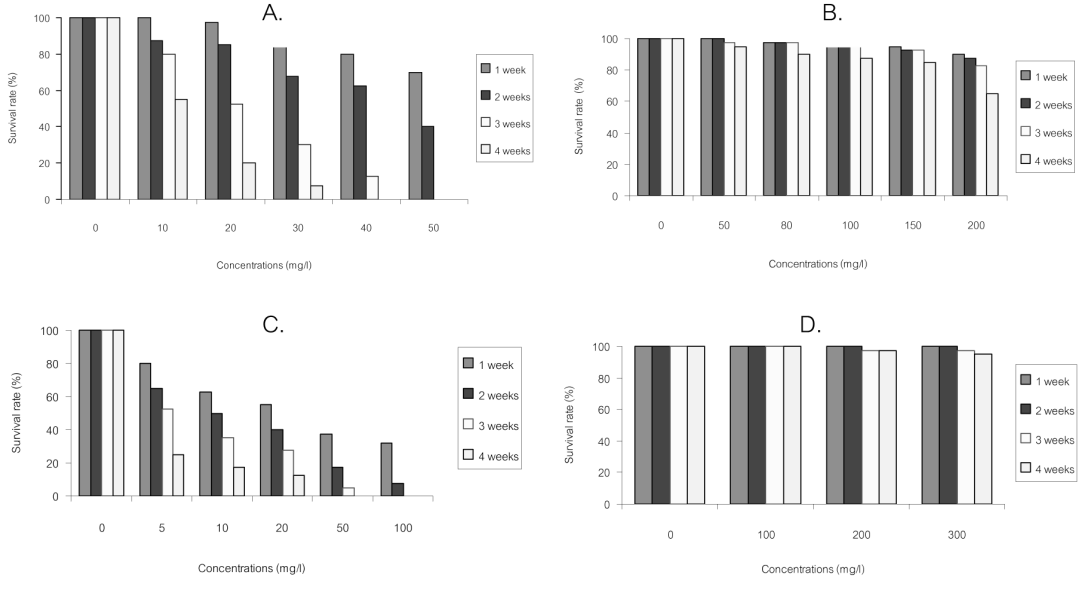

Figure 1 Effect of types and concentrations of antibiotics on viability of oil palm embryogenic calli cultured for 4 weeks. A. Hygromycin B. Kanamycin C. Phophinotricin D. Cefotaxime

Table 1 Effect of kanamycin at difference concentrations on percentage of embryogenic calli induction and number of embryogenic callus/explants of oil palm cultured for 4 weeks.

Kanamycin concentrations (mg/l)	Embryogenic callus induction (%)	Number of embryogenic calli/ explant
0	100a	4.33±2.88
50	12.50 b	0.83±1.67
80	0 d	0.00±0.00
100	2.50 c	1.92±2.32
150	15 b	3.89±2.53
200	5 c	1.00±2.00
F-test	*	ns
C.V. (%)	34.56	27.10

*Significant different at $p \leq 0.05$

Means followed by the same letter do not different significantly, compared with Duncan Multiple Range Test (DMRT)

Table 2 Effect of cefotaxime at difference concentrations on percentage of embryogenic calli induction and number of embryogenic callus/explants of oil palm cultured for 4 weeks.

Cefotaxime concentrations (mg/l)	Embryogenic callus induction (%)	Number of embryogenic calli/ explant
0	100 a	4.33±2.88 a
100	15 c	1.31±0.32 b
200	75 b	5.35±2.87 a
300	5 d	0.95±0.59 c
F-test	*	*
C.V. (%)	26.33	10.17

*Significant different at $p \leq 0.05$

Means followed by the same letter do not different significantly, compared with Duncan Multiple Range Test (DMRT)

สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเมื่อเข้าไปเกาะที่ binding site ของ elongation factor2 (EF2) จะยับยั้ง peptide chain elongation ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ เซลล์จึงไม่สามารถเจริญและพัฒนาได้ ในขณะที่พืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน *hpt* จะสามารถเจริญและพัฒนาได้ตามปกติ เนื่องจากยีนดังกล่าวมีรหัสสำหรับสร้างเอ็นไซม์ hygromycin phosphotransferase ซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน โดยมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่หมู่ไฮดรอกซิลของไฮโกรมัยซิน (สุมนทิพย์, 2540; อ้างโดยกัลยา, 2550) การศึกษานี้พบว่า ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสรอดชีวิตได้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงใช้ไฮโกรมัยซินความเข้มข้นนี้ในการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Men et al. (2003) ที่ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือก Protocom-Like Bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่าง Dendrobium phalaenopsis Banyan Pink และ *D. nobile* ที่ได้รับการถ่ายยีน Abdullah et al. (2005) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือก immature embryo ที่ได้รับการถ่ายยีน

แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 2 : 72-79 (2554).

ในปาล์มน้ำมัน สารปฏิชีวนะคานามัยซินเมื่อเข้าไปเกาะที่ binding site ของ 30S ribosomal จะยับยั้ง plastid translation (McCabe and Martinell, 1993) ทำให้เซลล์พืชไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ เซลล์พืชจึงไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ (Kapaun and Cheng, 1999) ในขณะที่พืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน *hpt* II มีรหัสสำหรับสร้างเอ็นไซม์ neomycin phosphotransferase ซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานสารปฏิชีวนะคานามัยซิน สามารถเจริญพัฒนาได้ตามปกติ (Flavell et al., 1992) นอกจากนี้คานามัยซินมีคุณสมบัติส่งเสริมการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชบางชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L.) พบว่า อัตราการสร้างแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนพืช สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน (Bao-Hon et al., 2001) การศึกษานี้ พบว่าคานามัยซินเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากความเข้มข้นนี้เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำที่สุดคือ 65 เปอร์เซ็นต์ แต่ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณและจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสน้อยกว่าความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สารปฏิชีวนะฟอสโฟทริซินเป็นสารปราบวัชพืชที่นิยมนำมาใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ยีน *bar* ควบคุมการสร้างเอ็นไซน์ phosphinothricin acetytransferase มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthase ที่ใช้ในกระบวนการ aminonia assimilation ซึ่งปกติพืชเปลี่ยน glutamate เป็น glutamine ด้วย NH^{+}_{4} (แอมโมเนียม) แต่ฟอสโฟทริซินทำให้แอมโมเนียมรวมกับ glutamate ไม่ได้ จึงเกิดการสะสมแอมโมเนียม ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์พืช (Krieg et al., 1990; Schulz et al., 1990) ดังนั้นพืชที่มียีนนี้อยู่จะมีลักษณะต้านทานต่อสารปราบวัชพืช bialaphos การศึกษานี้พบว่า ฟอสโฟทริซินเป็นพิษต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันสูงกว่าสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นของสาร 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีชีวิตรอดเพียง 25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น สารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน เป็นสารชนิด β-lactam ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก (Mathias and Boyd, 1986; อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ซีโฟทาซิมจะเข้าไปจับกับเอ็นไซม์ peptidoglycan transpeptidase ทำให้ไม่มีการเชื่อมต่อของสาย peptidoglycan มีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งกลไกดังกล่าวไม่มีผลต่อเซลล์พืช นอกจากนี้พบว่า ซีโฟทาซิม มีผลทั้งส่งเสริมและยับยั้งพัฒนาการของเซลล์ การศึกษานี้พบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เนื่องจากส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส สอดคล้องกับการศึกษาของ Caboni et al. (2002) ที่พบว่า การเติมซีโฟทาซิมในอาหารเพาะเลี้ยงใบ wild pear ส่งเสริมอัตราการสร้างยอด และจำนวนยอดต่อชิ้นพืชได้ดีกว่าอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซิม ส่วน Chai et al. (2002) พบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อส่วนเกิน หลังการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* อย่างไรก็ตามในการถ่ายยีนเข้าสู่ immature embryo ของปาล์มน้ำมัน Abdullah et al. (2005) พบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่จะนำมาใช้กำจัดเชื้อส่วนเกิน ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่จะนำมาใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชนิดของเนื้อเยื่อพืช

ระยะเวลาการบ่มเชื้อ วิธีการเลี้ยงร่วม และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมัน

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบ่มร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เลี้ยงร่วมกับเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และบ่มร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เลี้ยงร่วมกับเชื้อบนกระดาษกรอง

หรือบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนเท่ากันคือ 50 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในชุดควบคุม และที่บ่มร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 30 นาที เลี้ยงร่วมกับเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงหรือบนกระดาษกรองเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีน (ข้อมูลไม่ได้แสดง) แต่พบจุดสีน้ำเงินเนื่องจากการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด (8 จุดต่อชิ้นส่วน) ที่ระยะเวลาการบ่มเชื้อ 6 ชั่วโมง เลี้ยงร่วมบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นสภาวะนี้จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันมากที่สุด สอดคล้องกับ Sugimura et al. (2005) ที่พบว่า การบ่มแคลลัสของ patchouli ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการถ่ายยีนมากที่สุด ในขณะที่ สุภาวดี (2548) พบว่า โพรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cymbidium findlaysonianum* Lindl บ่มร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุด ส่วน Men et al. (2003) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ *D. nobile* โดยใช้เวลาในการบ่ม PLBs ร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ส่วนระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียนั้น Kushikawa et al. (2001) พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ Saintpaulia ionantha Wendl ส่วน Chai et al. (2002) พบว่า การเลี้ยง PLBs ร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งเสริมประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs กล้วยไม้ *Phalaenopsis* สูงถึง 77.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Yu et al. (2001) พบว่า การเลี้ยง PLBs กล้วยไม้หวายร่วมกับเชื้อเป็นเวลานานส่งเสริมประสิทธิภาพในการถ่ายยีนให้สูงขึ้น แต่การศึกษานี้พบว่า เมื่อเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้อเป็นเวลานาน คือ 72 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง สอดคล้องกับ Belarmino et al. (2000) ที่พบว่า การเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 5-7 วัน ไม่เพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* แต่ส่งผลให้เซลล์พืชตายมากขึ้น ส่วนวิธีการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อในการศึกษานี้พบว่า มีผลต่อประสิทธิภาพถ่ายยีนน้อยกว่าระยะเวลาการบ่มเชื้อและการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ

อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกอายุ 6 สัปดาห์ไปตรวจสอบการมีอยู่อย่างถาวรของยีน *gus* และยีน *hpt* ด้วยเทคนิค PCR ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสอง เนื่องจากยีน *gus* ที่ใช้ศึกษาอยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ CaMV35S ทำให้ยีน *gus* มีการแสดงออกในชิ้นส่วนแบบไม่จำเพาะเจาะจง การศึกษานี้พบจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นเนื่องจากการแสดงออกอย่างชั่วคราวของยีน *gus* บริเวณส่วนฐาน และบริเวณรอบๆ ชิ้นส่วน ไม่พบจุดสีน้ำเงินบนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกิดขึ้นใหม่บนเอ็มบริโอเจนนิกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งนี้เนื่องจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้ใหม่เกิดจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนแบบ chimeric (Yu *et al.*, 1999) สอดคล้องกับการศึกษาของ Christo and Ford (1995) ที่พบว่า แคลลัสหรือชิ้นส่วนพืชที่มีการแสดงออกของยีน chimeric ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่ง Chia et al. (1994) พบการแสดงออกหลังการถ่ายยีนแบบ chimeric ค่อนข้างสูงในกล้วยไม้ ดังนั้นการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนถือเป็นขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่ง โดยเฉพาะในปาล์มน้ำมันที่การแสดงออกของการถ่ายยีนเป็นแบบ chimeric มีโอกาสสูงมากที่การพัฒนาของเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเกิดจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายยีน ในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่รอดชีวิตจากการถ่ายยีน และชักนำพืชต้นใหม่ ต้องมั่นใจว่าพืชต้นใหม่ที่ชักนำได้ต้องเกิดจากเซลล์เดี่ยว ๆ เท่านั้น จึงจะประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน หากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นมีความเหมาะสม ก็จะส่งเสริมความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีพันธุวิศวกรรมต่อไป

Table 3 Inoculation times, co-culture methods and co-culture times on efficiency of oil palm embryogenic calli transformation

Inoculation times	Co-culture methods	Co-culture times	Transient expression (%)	Number of blue spots/explant	Concentration of bule spot/explant
4 hr	On culture medium	48	0	0	-
		72	50	2.5	+
	On whatman paper	48	0	0	-
		72	0	0	-
6 hr	On culture medium	48	50	8	++
		72	50	2.5	+
	On whatman paper	48	50	3	+
		72	50	1.5	+
8 hr	On culture medium	48	25	1	+
		72	25	1	+
	On whatman paper	48	25	1	+
		72	25	1	+

สรุป

ชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อร่วมกับชิ้นส่วนพืช และระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนพืชกับเชื้อมีผลต่อความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่า

ไฮโกรมัยซิน คานามัยซิน และ ฟอสฟิโนทริซิน ความเข้มข้น 20 200 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เหมาะสมที่จะนำใช้คัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน ซีโฟทาซีม ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่จะนำมาใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย การบ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เลี้ยงร่วมบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันมากที่สุด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา เซ่เอี๊ยบ. 2551. การปลูกถ่ายยีนในกล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูรโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

กรมวิชาการเกษตร. 2550. เอกสารวิชาการเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย, กรุงเทพมหานคร.

กัลยา รัตนถาวรกิติ. 2550. การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ ชัยรัตน์ นิลนนท์ ธีรพงศ์ จันทรนิยม ประกิจ ทองคำ และ หะสัน ถือมะ. 2546. คู่มือปาล์มน้ำมันและการจัดการสวน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สุภาวดี ถาวโร. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด (*Cymbidium findlaysonianum* Lindl.) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช.

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.

Aberlence, B.F., Noirot, M., and Duval, Y. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 56:53-57.

Bao-Hon Z., L Fang, L Zhi-Hong, W. Hong-Mei, and Y. Chang-Bing. 2001. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. Plant Growth Regulation 33:137–149.

Belarmino, M.M., and Mii, M. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Phaleanopsis* orchid. Plant Cell Rep. 19:435-442.

Caboni, E., S. D'Angeli, A. Chiappetta, A.M. Innocenti, H. Onckelen Van, and Damiano, C. 2002. Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 70:199-206.

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

Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y. Kim, and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Hort. Sci. 96:213-224.

Christo, P., and T.L. Ford. 1995. The impact of selection parameters on the phenotype and genotype of transgenic rice callus and plants. Transgenic Res. 4:44-51.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Flavell, R.B, E. Dart, R.L. Fuchs, and R.T. Fraley. 1992. Selectable marker genes: safer for plants. Bio. Technology 10:141–144.

Guerra, M. P., and W. Handro. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palme): control and structure feature. J. Plant Res. 111:65-71.

Jefferson, R.A., T.A. Javangh, and M.W. Bevan. 1987. Gus fusion : β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907.

Kapaun, J.A, and Z.M. Cheng. 1999. Aminoglycoside antibiotics inhibit shoot regeneration from Siberian elm leaf explants. Hortsciences 34: 727–729.

Krieg, L.C., M.A. Walker, and T. Senaratna. 1990. Growth, ammonia accumulation and glutamine synthetase activity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) shoots and cell cultures treated with phosphinothricin. Plant Cell Rep. 9:80-83.

Kushikawa S., Y. Hoshino and M. Mii. 2001. *Agrobacterium* -mediated transformation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Science 161:593-960

McCabe, D.E, and B.J Martinell. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. Biotechnology 11:596–598.

Men, S., X. Ming, R. Liu, C. Wei, and Y. Li. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 75:63-71.

Murashige, T., and F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Phys. Plant. 15:473-497.

Schulz, A., F. Wengemnayer, and H.M. Goodman. 1990. Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. Crit. Rev. Plant Sci. 9:1-15.

Sugimura, Y., N. Kadotani, Y. Ueda, and K. Shima. 2005. Transgenic patchouli plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 82:251-257.

Te-chato, S. 1998. Callus induction from cultured zygotic embryo of oil palm subsequent to plantlet regeneration. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 20:1-6.

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

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

Yu, H., S.H. Yang, and C.J. Goh. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *doh1*. Plant Cell Rep. 20: 301-305.