

การพัฒนากระเจียวดัดแปลงพันธุกรรม

ปรียา พวงสำลี¹ หวังสมนึก¹ พินิจ หวังสมนึก¹ ธมลวรรณ สีป้อ¹ วิชัย ณรัตน์พันธุ์¹ และ ประสิทธิ์ ใจศิริ²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002 ²ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Development of Transgenic *Curcuma*

Preeya Puangsomlee Wangsomnuk¹, Pinich Wangsomnuk¹, Thamolwan Seepor¹,
Wichai Neerattanaphan¹ and Prasit Jaisil²

¹Department of Biology Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand; ²Department of Agronomy
Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสร้างกระเจียวดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อนำไปพัฒนากระเจียวที่เหมาะสมสำหรับตลาดไม้ประดับ พบว่าสามารถชักนำการสร้างแคลลัสชนิดร่วนซุยจากแคลลัสซึ่งมีความสามารถเกิดเป็นเอ็มบริโอของกระเจียวหลายชนิดที่ศึกษา และชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่ที่สามารถให้ผลได้ และได้ทำการส่งถ่ายยีนซึ่งเป็นรหัสของ Green Fluorescent Protein (GFP) เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของกระเจียว เพื่อศึกษาการแสดงของยีนแบบ transient gene expression นอกจากนี้ยังได้ปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธีการที่ใช้เพื่อชักนำให้ได้ส่วนยอดของพืชจากชิ้นส่วนพืชที่ศึกษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการส่งถ่ายยีนสู่พืชและการปรับปรุงพันธุ์กระเจียวต่อไป

Abstract

The capacity to integrate transgenes into the *Curcuma* plants is being established in order to generate plants expressing traits of ornamental interest. Several *Curcuma* species were also examined for callus production and plant regeneration. Our results showed, for the first time, the ability to regenerate the whole plants from friable embryogenic callus of several *Curcuma* species. Green Fluorescent Protein (GFP) has been directly transformed into *Curcuma* protoplasts for transient gene expression studies. The protocol for improving the recovery of plants via shoot organogenesis from explants is being investigated which could be very useful for genetic transformation and *Curcuma* plant breeding program.

บทนำ

แม้ว่าปริมาณการส่งออกของปทุมมาและกระเจียว ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Curcuma* เพื่อนำไปใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับจะเพิ่มมากขึ้นทุกปี การพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ยังเป็นไปอย่างช้าๆ จึงจำเป็นต้องสร้างองค์ความรู้ใหม่เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กระเจียว ซึ่งเป็นพืชที่พบมากกว่า 30 ชนิดในประเทศไทย และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมายไม่ว่าในการประกอบอาหาร ใช้เป็นเครื่องเทศ สมุนไพร เครื่องสำอาง และเป็นไม้ดอกไม้ประดับ การพัฒนากระเจียวตัดแปรพันธุ์กรรมจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าขั้นสูงในด้านต่างๆ ต่อไป เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีน และพันธุวิศวกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ เป็นต้น

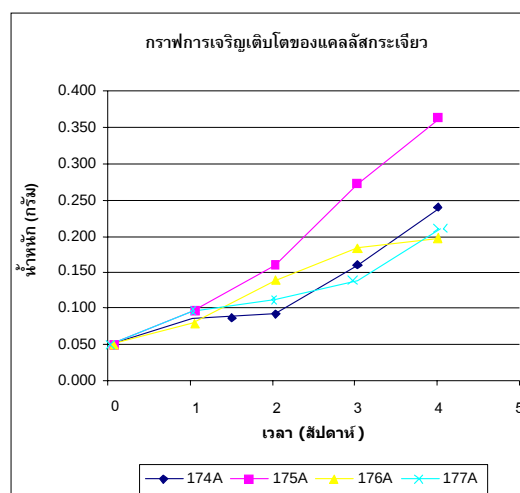
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของสูตรอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำตาข้างของกระเจียวให้สร้างแคลลัสและเพิ่มปริมาณแคลลัส
2. ศึกษาผลของสูตรอาหารและสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นใหม่
3. ทำการสกัดโปรโทพลาสต์และการถ่ายยีน GFP เข้าสู่โปรโทพลาสต์กระเจียว

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

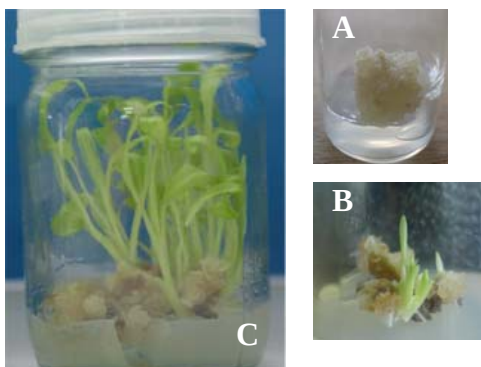
จากการทดลองสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากตาข้างของกระเจียวได้ในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4 - D ความเข้มข้น 1, 2 และ มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบการเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2, 4 - D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีลักษณะร่วนมีสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน ขึ้นอยู่กับชนิดของกระเจียวที่นำมาเพาะเลี้ยง นอกจากนี้เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่มี

ฮอร์โมน NAA และ BA ความเข้มข้น 2.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง



ภาพที่ 1: กราฟการเจริญเติบโตของแคลลัสกระเจียวในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดย 174A (B5 เติม 2,4-D 2 มก/ล), 175A (B5 เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 2.5 และ 1 มก/ล), 177A (MS เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 2.5 และ 1 มก/ล) และ 176A (MS เติม 2,4-D 2 มก/ล)

สำหรับการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์จากแคลลัสกระเจียวนั้น ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสกระเจียวบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA, BA, 2, 4 - D และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณบนอาหารที่ใช้เลี้ยงได้ อาหารบางสูตรมีผลชักนำให้เกิดรากและช่อดอกขึ้นรอบแคลลัส และอาหารบางสูตรสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus และมีสีเขียวในหลายบริเวณเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ดัดแปลงที่เติมฮอร์โมน NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีการเกิด somatic embryo จาก friable embryogenic callus และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นและยอดได้ในที่สุด (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2: แสดงการชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัส (A) และการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์จากแคลลัสกระเจียว (B และ C)

เมื่อนำแคลลัสกระเจียวที่ได้มีการศึกษาแล้วว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ มาสกัดโปรโทพลาสต์โดยการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเพกตินเนส พบว่าได้โปรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจำนวนมากกว่า 2×10^6 โปรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จึงนำมาใช้เพื่อการส่งถ่ายยีน GFP (Green Fluorescent Protein) โดยอาศัย PEG เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนจากการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ก็พบว่า ยีน GFP สามารถแสดงออกได้ในโปรโทพลาสต์กระเจียว

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยสามารถชักนำการสร้างแคลลัสชนิดร่นชุยจากแคลลัสซึ่งมีความสามารถเกิดเป็นเอ็มบริโอของกระเจียวหลายชนิดที่ศึกษา และชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ และสามารถส่งถ่ายยีนซึ่งเป็นรหัสของ Green Fluorescent Protein เข้าสู่โปรโทพลาสต์ของกระเจียวได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการส่งถ่ายยีนสู่พืชและการปรับปรุงพันธุ์กระเจียวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่โครงการนี้ ประเพณเงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2547

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

นายยศินทร์ กิติจันทร์โรภาส ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมต้นฉบับนี้

เอกสารอ้างอิง

- ปรียา พวงสำลี, พินิจ หวังสมนึก และบุญถม มาชา. 2545. การศึกษาความหลากหลายและหาแนวทางการพัฒนาการผลิตพืชและปรับปรุงพันธุ์ในสกุล *Curcuma* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยวิธีพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 69 หน้า.
- Guo, W., Duan, Y., Olivares-Fuster, O., Wu, Z., Arias, C.R., Burns, J.K., and Grosser, J.W. 2005. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. Plant Cell Rep. May 4.