การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco.) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

Tissue Culture of *Citrus reticulata* Blanco. cv. Shogun and Gene Transformation by Agrobacteria

สนธยา หนูด้วง

Sontaya Nudoung

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2541

Order Key 19190

BIB Key 151091

050 เลขหมู่ QK495.R98 ส33 2541

เลขทะเบียน 25 พ.ย. 2541

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco.) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย
ผู้เขียน	นายสนธยา หนูด้วง
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2541

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco.) ในอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้การสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ จากต้นกล้าในอาหารสูตร MS หรือ MT เติมไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า อาหารสูตร MT ให้การสร้างยอดรวมได้ดีกว่าอาหารสูตร MS และระหว่างไซโตไคนินที่ทดสอบ BA ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมมากที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดและลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 85 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิ้นส่วนตาข้างให้การสร้างยอดรวม 58.33 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อย้ายยอดรวมไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดใหม่ยืดยาวได้ดีที่สุด โดยให้ความยาวยอดเฉลี่ย 1.03 เซนติเมตร ลำต้นเหนือใบเลี้ยงให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.5 ยอด รองลงมาคือปลายยอดและตาข้าง ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.35 และ 4.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการชักนำยอดรวมในอาหารเติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดได้มากที่สุด 97.50 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้ดีที่สุด 72.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากตาข้างได้ดีที่สุด 47.50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายกลุ่มยอดรวมไปเลี้ยงในอาหารเติม BA และ GA_3 เข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า กลุ่มยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีการเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด 5.90 ยอด รองลงมาคือ ตาข้าง และปลายยอด ซึ่งให้ยอดรวม 4.4 และ 4.23 ยอด ตามลำดับ ยอดใหม่มีการสร้างรากได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีชีวิตรอดหลังปลูกลงดิน

ในกรณีการปลูกถ่ายยีน ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 และ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด คานามัยซินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมและเหมาะสมในคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนได้ดีที่สุด ส่วนไฮโกรมัยซินยับยั้งการ

สร้างยอดรวมและไม่เหมาะสมในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน การเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1.2x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดมากที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายเชื้อ LBA4404 และ *A. rhizogenes* สายเชื้อ A13 ให้การสร้างยอดรวมได้ดีเมื่อใช้ความหนาแน่นสูง การเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยวิธีการหยดเชื้อ ให้การสร้างยอดได้ดีกว่าการเลี้ยงร่วมโดยวิธีการจุ่มแช่ การตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบ มีเพียงการต้านทานต่อคานามัยซินได้เพียงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น

Thesis Title	Tissue Culture of *Citrus reticulata* Blanco. cv. Shogun and Gene Transformation by Agrobacteria
Author	Mr. Sontaya Nudoung
Major Program	Plant Science
Academic Year	1998

Abstract

Seedlings of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco.) were obtained from germination in MS (Murashige and Skoog) free hormone and various explants of them were cultured on two different media supplemented with various kinds and concentrations of cytokinins. The results showed the MT (Murashige and Tucker) medium resulted in greater shoot formation than the MS medium. Among the cytokinins tested, BA (benzyladenine) gave the best result in percentage of shoot formation of 75 % from epicotyl explants. MT medium supplemented with 0.5 mg/l BA gave the greatest percentage of shoot formation of 85 and 75 % from shoot-tip and epicotyl explants, respectively, while MS medium supplemented with 0.3 mg/l BA provided the greatest percentage of shoot formation of 58.33 % from nodal explants. When a cluster of shoots was transferred to the same medium supplemented with 0.1 mg/l GA_3 (gibberellic acid) they elongated the best. The average shoot length was 1.03 cm. In the case of explant types, epicotyls provided the greatest number of shoots of 5.5 shoots/explant, followed by shoot-tip and nodal explants which gave 5.35 and 4.76 shoots/explant, respectively. In the case of culturing on media supplemented with BA and NAA (naphthalene acetic acid), the frequency of shoot formation was highest from shoot-tip explant (97.50%) in a medium with 2.5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA or 1 mg/l BA and 0.25 mg/l NAA, followed by epicotyls (72.50%) in a medium with 1 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA, and nodal explants (47.50%) in a medium with 0.5 mg/l BA and 0.25 mg/l NAA, respectively. When a cluster of shoots was transferred to the same medium supplemented with BA and GA_3 at equal concentration of 0.1 mg/l they proliferated the best. In the case of explant type, epicotyls provided the greatest number of shoots at 5.90 shoots/explant, followed by nodal and shoot-tip explants which gave 4.4 and 4.23 shoots/explant, respectively.
The greatest percentage and number of roots could be induced in half strength MS medium with 1 mg/l NAA. Rooted shoots could be transferred to soil successfully.

In the case of gene transformation, cefotaxime at concentrations of 300 and 350 mg/l gave the best result in elimination of bacteria of 100 %, but concentration at 300 mg/l provided the greatest shoot formation. 50 mg/l kanamycin and 300 mg/l cefotaxime gave the best result in shoot formation and suitability for selection transformants,while hygromycin inhibited shoot formation and was not suitable for selection of transformants. Epicotyls co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens*,EHA101, carrying plasmid pIG121 at density of 1.2×10^7 cells/ml, gave the best percentage of shoot formation at 53.33 % on media containing 50 mg/l kanamycin. The average number of shoots was 1.60 shoots/explant. Co-cultivation of epicotyl explants with *A. tumefaciens*, LBA4404 carrying plasmid pBI221, was necessary to use the higther density. A co-cuture method of dropping a solution of agrobacteria on the upper cut end of the explant provided the best result in shoot induction. Histochemical studies were also carried out. β-glucuronidase (GUS) activity was not detected. Accordingly, resistance to kanamycin was the only marker used for detecting transformability.