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

เลขหมู่ QK495.R98 ส33 2541 ฉ.2

Bib Key 191091

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

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำทั้งในด้าน การเรียน การวิจัย และการเขียน วิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ มงคล แช่หลิม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วง ขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ และคณาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอน และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างสูง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง และขอบคุณ พี่สาว น้องสาว และน้องชาย ที่ค่อยให้กำลังใจตลอดมา

สนธยา หนูด้วง

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	12
2. วิธีการวิจัย	13
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	13
วิธีการศึกษา	16
3. ผล	22
4. วิจารณ์	81
5. สรุป	91
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก	101
ประวัติผู้เขียน	105

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลของ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการพัฒนาการของเมล็ดส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	22
2. ผลของไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	25
3. ผลของ BA หรือ TDZ ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	29
4. ผลของ BA หรือ TDZ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	30
5. ผลของ BA หรือ TDZ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	31
6. ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	33
7. ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างจำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	34
8. ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	37
9. ผลของ BA และ NAA ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	43
10. ผลของ BA และ NAA ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	44
11. ผลของ BA และ NAA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	46
12. ผลของ BA และ GA_3 ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน	49
13. ผลของ BA และ GA_3 ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อความยาวยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน ที่ผ่านเลี้ยงในอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน	50

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14. ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆต่อการยืดยาวของยอดส้มโชกุน หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 1 เดือน โดยการวัดจำนวนใบและความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น	51
15. ผลของ NAA และ IBA ต่อการสร้างรากจากยอดใหม่ส้มโชกุน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน และการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก 1 เดือน	54
16. ผลของคานามัยซินและซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงของต้นกล้าส้มโชกุนอายุ 1 เดือน ที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MT ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน	63
17. จำนวนและเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนที่เลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA4404 ในอาหารเติมคานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ตรวจผลจำนวนยอดเฉลี่ยหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	64
18. ผลของความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง หลังวางเลี้ยงในอาหารเติม คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟทาซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	68
19. จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยของยอดใหม่จากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทเวลาแตกต่างกัน	73
20. ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นเหนือใบเลี้ยง	78

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ต้นกล้าที่ชักนำจากเมล็ดส้มโชกุนในอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างกัน	23
2. ยอดรวมที่ชักนำจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนในอาหารเติม BA หรือ KN หรือ 2-iP	26
3. ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุนในอาหารเติม BA หรือ TDZ	28
4. ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารสูตร MS หรือ MT เติม BA ความเข้มข้นต่างกัน	35
5. ผลของ GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน	39
6. ยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุนที่เลี้ยงในอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน	40
7. ผลของ GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อความยาวยอดจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน	41
8. ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารสูตร MT เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน	47
9. ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยืดยาวของยอดส้มโชกุน	52
10. ยอดใหม่ส้มโชกุนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 ความเข้มข้นต่างกัน	52
11. รากจากยอดส้มโชกุนที่ชักนำในอาหารเติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้นต่างกัน	55
12. ส้มต้นใหม่หลังย้ายปลูกลงดิน 1 เดือน	56
13. ผลของซีโฟทาซิมต่อการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มโชกุน	57
14. ผลของซีโฟทาซิมต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน	58
15. ผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน	59
16. ยอดรวมที่ชักนำในอาหารเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่างกัน	59
17. ผลของคานามัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน	60
18. ผลของคานามัยซินต่อจำนวนและความยาวยอดจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน	61
19. ยอดรวมที่ชักนำในอาหารเติมคานามัยซินความเข้มข้นต่างกัน	61

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20. ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างกัน	62
21. เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน	67
22. ยอดรวมที่สร้างจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงซึ่งเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน	69
23. เปอร์เซ็นต์การตายของยอดใหม่จากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน	70
24. เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทเชื้อในเวลาต่างกัน	72
25. ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทในเวลาต่างกัน	74
26. เปอร์เซ็นต์การตายของยอดใหม่จากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทเชื้อในเวลาต่างกัน	75
27. เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและวิธีการที่แตกต่างกัน	77
28. ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและวิธีการที่แตกต่างกัน	79
29. เปอร์เซ็นต์การตายของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและวิธีการเลี้ยงร่วมที่แตกต่างกัน	80

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2-iP	=	2-isopentenyl adenine
ABA	=	abscisic acid
BA/BAP	=	benzyladenine/ benzylaminopurine
DMRT	=	Duncan's Multiple Range Test
GA_3	=	gibberellic acid
GUS	=	β-Glucuronidase
IAA	=	indoleacetic acid
IBA	=	indolebutyric acid
KN	=	kinetin
LB	=	Luria Broth
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
MT	=	Murashige and Tucker (medium)
NAA	=	naphthaleneacetic acid
T-DNA	=	transfer DNA
TDZ	=	thidiazuron
X-gluc	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
YEB	=	yeast extract broth

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ส้มเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญนิยมปลูกกันทั่วโลก แหล่งกำเนิดส้มอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับการนำมาปลูกในไทยพบว่าชาวจีนเป็นผู้นำเข้ามาเมื่อประมาณ พ.ศ. 2400-2410 ปัจจุบันมีการปลูกส้มทั่วประเทศเนื่องจากมีสภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม (อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์, 2527) พืชตระกูลส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ปลูกมากที่จังหวัดปทุมธานี สระบุรี แพร่ ส้มจุก ปลูกมากที่จังหวัดสงขลาและนครศรีธรรมราช มะนาว ปลูกมากที่จังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร นครศรีธรรมราช ส้มโชกุน ปลูกมากที่จังหวัดยะลา ชุมพร กระบี่ และส้มโอ ปลูกมากที่จังหวัดนครปฐม อุทัยธานี ชุมพร (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540) ตลาดต่างประเทศที่สำคัญคือ ฮ่องกง สิงคโปร์ และมาเลเซีย การส่งออกส้มโอสามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นมูลค่า 56.1 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2538 (เปรมปรี ณ สงขลา, 2540) และเพิ่มเป็น 66.4 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2539 (นิวัตร์ ธรรมภิบาล และ ชนิษฐา วิเมศ, 2540)

ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco) อยู่ในตระกูล Rutaceae กลุ่มแมนดาริน เป็นส้มที่กลายพันธุ์จากการปลูกด้วยเมล็ด พบครั้งแรกทางภาคใต้ของประเทศไทยที่จังหวัดยะลา จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เพชรยะลา ลักษณะทั่วไปมีขนาดผลใหญ่กว่าส้มเขียวหวานพันธุ์บางมดเล็กน้อย ลักษณะพิเศษคือ มีคุณภาพผลดี สีเนื้อเป็นสีส้ม เนื้อนิ่ม มีกลิ่นหอม เปอร์เซ็นต์น้ำส้มสูง (มงคล แช่หลิม, 2535) เป็นที่นิยมบริโภคกันมากในปัจจุบัน แต่ปัญหาหลักในการปลูกส้มโดยทั่วไปคือโรคและแมลงทำความเสียหายแก่ต้นส้ม โดยเฉพาะปัญหาเรื่องโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น โรคทริสเตซา โดยมีแมลงพาหะคือเพลี้ยอ่อน (อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ และคณะ, 2526) ทำให้ต้นส้มทรุดโทรมและตายในที่สุด มีการนำวิธีการต่างๆ มาใช้ป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อดังกล่าว เช่น การคัดเลือกกิ่งพันธุ์ที่ปราศจากโรคโดยมีการตรวจสอบก่อน การป้องกันและกำจัดแมลงที่อาจเป็นพาหะนำโรค เช่น เพลี้ยอ่อน นอกจากนี้ได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด การเสียบยอดในหลอดทดลองเป็นการนำปลายยอดขนาดเล็กของต้นพันธุ์มาเสียบยอดบนต้นกล้าส้มที่เพาะในหลอดทดลอง เพื่อผลิตส้มปลอดโรค (Navarro *et al.*, 1975) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิวเซลลัส (Rangan *et al.*, 1969 อ้างโดย Navarro, 1984) และทำการเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมากอย่างไรก็ตามวิธีการผลิตส้มปลอดโรคดังกล่าวไม่สามารถที่จะป้องกันโรคจากเชื้อไวรัสได้สมบูรณ์เพราะเมื่อนำต้นส้มที่ปลอดโรคปลูกลงดินมีโอกาสที่แมลงพาหะนำโรคมาทำลายต้นส้มได้อีกถ้าไม่มีการป้องกันกำจัดแมลงพาหะนำโรคที่ดีพอ จึงต้องมีการเสียค่าใช้จ่ายมากในการป้องกันกำจัดโรคและแมลง ปัจจุบันได้มีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินมา

ทดลองเป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายยีนเพื่อศึกษาหาแนวทางในการนำยีนต้านทานไวรัสมาใช้ป้องกันโรคในส้มหลายชนิด เช่น Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) Swingle citrumelo (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata*) และ Key lime (*C. aurantifolia* (Christm) Swing.) (Moore *et al.*, 1992) Sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Pena *et al.*,1995b) โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มี Ti plasmid (tumour inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้างปุ่มปมในพืช และ *Agrobacterium rhizogenes* ที่มี Ri plasmid (root inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้างรากลอยในพืช แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถส่งข้อมูลทางพันธุกรรมเข้าสู่พืชได้ทางบาดแผล การนำเชื้ออะโกรแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์โดยการตัดต่อยีนที่มีความสำคัญทางเศรษกิจ เช่น ยีนต้านทานไวรัส มาปลูกถ่ายเข้าสู่ส้มโชกุนที่อ่อนแอต่อโรค ก็จะได้ส้มจำลองพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไวรัส อย่างไรก็ตามในส้มโชกุนยังไม่มีการศึกษาการปลูกถ่ายยีน ดังนั้นก่อนที่จะมีการปลูกถ่ายยีนต้านทานไวรัส จำเป็นต้องศึกษาระบบการปลูกถ่ายยีนในส้มโชกุนเสียก่อน ในการศึกษานี้จึงมีการทดลองปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะคานามัยซินและยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ β-glucuronidase (GUS) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบระบบการปลูกถ่ายยีน

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้มมีลำต้นเป็นพุ่ม มีความสูงประมาณ 15-30 ฟุต ขึ้นกับชนิดของส้ม ระบบรากมีความลึกจากผิวดินประมาณ 2 ฟุต ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ยกเว้นส้มสามใบและลูกผสมส้มสามใบ โดยรูปทรงและขนาดของใบแตกต่างกันไปตามชนิดของส้ม เช่น ส้มกลุ่มแมนดาริน มีรูปร่างค่อนข้างเรียวแหลม ขนาดเล็ก การจัดเรียงตัวของใบเป็นแบบวนเป็นเกลียวรอบกิ่ง ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีตาดอก 2 ชนิด คือ ดอกที่เกิดจากตายอดและตาข้าง โดยดอกที่เกิดจากตาข้างจะร่วงเป็นส่วนใหญ่ กลีบดอกสีขาว มี 3-5 อัน เกสรตัวผู้มีเท่ากับหรือเป็นสองเท่าของกลีบดอก ยอดเกสรตัวเมียมีสีเหลือง ลักษณะกลม มีรังไข่เป็นแบบ superior ผลเป็นแบบเบอร์รี่ มี 10 พู เชื่อมติดกันเป็นวงกลมล้อมรอบแกนกลาง เมล็ดมีคัพภะหนึ่งหรือหลายคัพภะ โดยคัพภะที่เกิดจากการผสมพันธุ์เรียกว่า ไซโกติคเอ็มบริโอ และคัพภะที่เกิดจากการพัฒนาการของเซลล์นิวเซลล่า เรียกว่า นิวเซลล่าเอ็มบริโอ เมล็ดที่มีหลายคัพภะเรียกว่า โพลีเอ็มบริโอนี

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ (2531) เพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโอพันธุ์ทองดีในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BAP (6-benzyladenopurine) และ GA_3 (gibberellic acid) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อาหารเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ แต่การเติม BAP เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 3.5 ยอด ส่วนการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ GA_3 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวม 75.00 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ย 2.62 ยอด และการเติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 4.44 ยอด

Kitto และ Young (1981) ทดลองชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดส้ม Carrizo citrange (*C. sinensis* (L.) Osb.), Sour orange (*C. aurentium* L.) และ Cleopatra mandarin (*C. reshi* Hort.) จากต้นกล้าอายุ 12 เดือนที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง ซึ่งตัดชิ้นส่วนยอดที่จะเลี้ยงขนาด 1 เซนติเมตร มาฟอกฆ่าเชื้อและวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดไซโตไคนิน คือ BA (benzyladenine) KN (kinetine) และ 2-iP (2-isopentenyl adenine) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.1 ยอดต่อชิ้นส่วน ในส้ม Carrizo citrange รองลงมาคือส้ม Cleopatra mandarin และ Sour orange ชักนำยอดได้ 1.3 และ 0.9 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ต่อมา Barlass และ Skene (1982) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด ข้อและลำต้นของส้ม 5 พันธุ์คือ Carrizo citrange , Trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), Cleopatra mandarin, Rangpur

lime (*C. limonia* Osb.) และ Sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osb.) โดยการนำชิ้นส่วนยอดความยาว 3 เซนติเมตร จากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดและจากต้นที่ปลูกในโรงเรือนฟอกฆ่าเชื้อแล้วตัดแยกเป็นชิ้นส่วนปลายยอด ข้อและลำต้น สำหรับปลายยอดเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ปกติหรือสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งแต่ละสูตรเติม BA เข้มข้น 2.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ส่วนชิ้นส่วนข้อและปล้องวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จากการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดจากทั้งสองแหล่งไม่มีการสร้างยอดยกเว้นส้ม Carrizo citrange มีการสร้างยอดรวมภายในเวลา 3 เดือน และใบใหม่ที่สร้างจากชิ้นส่วนปลายยอดที่วางเลี้ยงในอาหารเหลวมีการบวมพองของส่วนก้านใบ เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งมีการสร้างยอดเกิดขึ้นตรงฐานก้านใบที่บวมพอง และส้ม Carrizo citrange ที่ได้จากโรงเรือนมีการสร้างใบใหม่บนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม BA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ส่วนชิ้นส่วนปลายยอดจากต้นกล้ามีการตอบสนองต่อสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ได้ดีกว่าในชิ้นส่วนปล้อง พบว่าชิ้นส่วนปล้องส้มทุกชนิดจากต้นกล้ามีการสร้างยอดรวมได้ดียกเว้นส้ม Rangpur lime และ Cleopatra mandarin ที่มีการสร้างยอดเพียง 1-2 ยอดเท่านั้นและยอดใหม่ส้ม Trifoliate orange มีการสร้างยอดเพียง 1 ยอดและมีปรากฏการณ์ข่มตาข้าง (shoot dominance) ส่วนชิ้นส่วนลำต้นจากต้นส้มที่ปลูกในโรงเรือนไม่มีการสร้างยอดเกิดขึ้นและในชิ้นส่วนข้อมีการสร้างยอดรวมจากตาข้างได้ดีในส้มทุกชนิดทั้งจากต้นกล้าและต้นที่ปลูกในโรงเรือน

Edriss และ Burger (1984) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และรากของส้ม Troyer citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Rat. x *Citrus sinensis* (L.) Osb.) จากต้นกล้าส้มที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง อายุ 2 สัปดาห์ ตัดแยกชิ้นส่วนราก (1 เซนติเมตร) ปลายราก (0.1-0.3 มิลลิเมตร) และลำต้นเหนือใบเลี้ยง (1 เซนติเมตร) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ร่วมกับ NAA (naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP เข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสได้ดีกับทุกชิ้นส่วน อาหารเติม BAP เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้โดยตรงจากชิ้นส่วนรากโดยไม่ผ่านการสร้างแคลลัส ส่วนชิ้นส่วนปลายรากไม่สามารถสร้างยอดได้ อาหารเติม BAP เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดจากแคลลัสของลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้ดี ในขณะที่อาหารเติม BAP เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้โดยตรงจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

Moore (1986) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงของต้นกล้าส้ม Sour orange, Cleopatra mandarin และ Carrizo citrange ที่เพาะเมล็ดในโรงเรือน อายุ 8 สัปดาห์ ฟอกฆ่าเชื้อและวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker) เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ และเติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ส้มทั้งสามชนิดมีการสร้างยอดได้ดีบนอาหารเติม BA เข้มข้น 22 ไมโครโมลาร์ อย่างเดียวหรือร่วมกับ NAA เข้มข้น 5.4 ไมโครโมลาร์

แต่อย่างไรก็ตามส้มทั้งสามชนิดให้จำนวนยอดแตกต่างกันโดยส้ม Carrizo citrange ให้จำนวนยอดรวมมากที่สุด 7.3 ยอด รองลงมาคือส้ม Sour orange และ Cleopatra mandarin ให้จำนวนยอดรวม 2.8 ยอด และ 2.0 ยอด ตามลำดับ แต่ในส้ม Carrizo citrange การเติม BA ความเข้มข้นต่ำๆ 1.1 และ 2.2 ไมโครโมลาร์ อย่างเดียวก็สามารถชักนำยอดรวมได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับส้มอีกสองชนิด

Duran-vila และคณะ (1989) ทดลองชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นและข้อส้ม 3 ชนิด คือ Sweet orange , Lime (*C. aurantifolia* (Christm. Swing) และ Citron (*C. medica*) บนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าส้ม Sweet orange และ Citron มีการสร้างยอดได้ดีที่สุด 5.3 และ 4.5 ยอด ตามลำดับ ในอาหารเติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนส้ม Lime สามารถชักนำยอดรวมได้ดีที่สุด 8.2 ยอด เมื่อเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงข้อ พบว่าส้ม Sweet orange และ Lime มีการสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด 5.0 และ 4.2 ยอด เมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนส้ม Citron มีการสร้างยอดรวมมากที่สุด 1.9 ยอด ในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Sim และคณะ (1989) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของส้มจี๊ด (*Citrus mitis*) จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองและต้นโตจากการทาบกิ่งอายุ 1.5 ปี บนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ วุ้น (Oxiod Bacteriological) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ในกรณีของต้นกล้า ลำต้นเหนือใบเลี้ยงส่วนปลายให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 90.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้จำนวนยอดมากที่สุด 2.2 ยอด เท่ากับชิ้นส่วนลำต้นส่วนกลางในอาหารเติม BAP ความเข้มข้นเดียวกัน สำหรับชิ้นส่วนใบส่วนโคนใบให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 50.0 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดมากที่สุด 4 ยอด เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในอาหารเติม BAP 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในกรณีชิ้นส่วนปลายยอดกับข้อ ให้การสร้างยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในอาหารเติมและไม่เติม BAP ส่วนจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพบว่า ปลายยอดและข้อให้จำนวนยอดมากที่สุด 3.7 และ 3.1 ยอด เมื่อเติม BAP 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นโตเต็มที่ พบว่า ใบไม่มีการสร้างยอดในขณะที่ปลายยอดและข้อให้การสร้างยอดรวมอยู่ในช่วง 66-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม BAP 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นชิ้นส่วนปลายยอดที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมเพียง 16.7 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพบว่าปลายยอดและข้อให้จำนวนยอดมากที่สุด 3.6 และ 2.4 ยอด เมื่อเติม BAP 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้มีการเพาะเลี้ยงรากจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 8 สัปดาห์ โดยตัดแบ่งรากเป็นส่วนต่างๆ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนโคนรากที่ติดกับต้นกล้าให้การสร้างยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติม BAP 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ให้จำนวนยอดรวมมากที่สุด 9.9 ยอด เมื่อเติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Bhat และคณะ (1992) รายงานการเพาะเลี้ยงรากของ Lime ที่ดูแลในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 9 12 และ 36 เดือน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างพืชต้นใหม่ โดยรากที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากการเพาะเลี้ยงช้อของลำต้นโตเต็มที่อายุมากกว่า 10 ปี ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ ตัดแยกรากไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมทุกเดือนเป็นระยะเวลาต่างๆ ช้างต้นจากนั้นตัดรากให้มีความยาว 50 มิลลิเมตร ย้ายไปเลี้ยงแบบสะพานบนกระดาษกรองในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA และ IAA (indoleacetic acid) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเวลาการเลี้ยงและดูแลรากนานขึ้นส่งผลให้การสร้างพืชต้นใหม่ลดลง รากเจริญเติบโตมากที่สุด 88.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.89 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ ส่วนการสร้างพืชต้นใหม่มากที่สุด 18.3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติม BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ โดยยอดใหม่เกิดขึ้นที่โคนรากตรงรอยตัดและด้านข้างของรากติดรอยตัด

Singh และคณะ (1994) เพาะเลี้ยงปลายยอดส้มพันธุ์ Khasi mandarin (*C. reticulata* Blanco.) และพันธุ์ Assam lemon (*C. limon* Burm.F.) จากต้นโตเต็มที่อายุ 5-6 ปี ในอาหารสูตร MS เติม BAP, KN และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าปลายยอดส้ม Khasi mandarin และ Assam lemon มีการสร้างยอดรวมมากที่สุด 70 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 6.1 และ 6.7 ยอด และมีความยาวยอด 2.6 และ 2.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ในอาหารเติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Goh และคณะ (1995) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ราก ปลายยอดและตาข้างของส้มโอ (*C. grandis* Osbeck) จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง ในอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ โดยชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ใช้จากต้นกล้าอายุ 14-16 วัน ตัดแบ่ง 3 ส่วน คือ ส่วนปลาย ส่วนกลางและส่วนโคนลำต้น ชิ้นส่วนราก ใช้จากต้นกล้าอายุ 4 สัปดาห์ ตัดให้มีความยาว 1.5 เซนติเมตร ทั้งสองชิ้นส่วนวางเลี้ยงในแนวนอน ส่วนชิ้นส่วนปลายยอดและตาข้าง ใช้จากต้นกล้าอายุ 3 และ 8 สัปดาห์ ตัดให้มีความยาว 5 มิลลิเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งบนอาหาร ทุกชิ้นส่วนวางเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์ จากการทดลอง พบว่า อาหารปราศจาก BA ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นส่วนกลางและโคนมากที่สุดเท่ากัน 83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำต้นส่วนปลายมีการสร้างยอดรวม 67 เปอร์เซ็นต์ การเติม BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างยอดรวมจากส่วนปลายลำต้นมากที่สุด 84 เปอร์เซ็นต์ แต่ BA เข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนปลายและกลางลำต้นมากที่สุด 3.4 และ 3.1 ยอด ตามลำดับ ส่วน BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนเฉลี่ยจากลำต้นส่วนโคนมากที่สุด 2.3 ยอด และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนราก พบว่า BA เข้มข้น 0.089 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างยอดรวมและจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 71 เปอร์เซ็นต์ และ 3.3 ยอด ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและตาข้าง พบว่า BA เข้มข้น 2.2 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างยอดรวมจากทั้งสองชิ้น

ส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ โดยปลายยอดจากต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ สร้างยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2.6 ยอด ส่วนปลายยอดและตาข้างจากต้นกล้าอายุ 8 สัปดาห์ สร้างยอดเฉลี่ยเท่ากัน 2.4 ยอด

Maggon และ Singh (1995) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใต้ใบเลี้ยงต้นกล้าส้ม Sweet orange พันธุ์ mosambi ที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BAP, GA_3 และ ABA (abscisic acid) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใต้ใบเลี้ยงมีการสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด 88 และ 71 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 14 และ 7 ยอด ตามลำดับ ในอาหารเติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรอย่างเดียว และมีการสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 40 และ 60 ยอด ตามลำดับ เมื่อเติม BAP เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ABA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามยอดรวมดังกล่าวมีการเจริญเติบโตช้ามากแต่เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดี

Balch และ Alejo (1997) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงของต้นกล้า Mexican lime (*C. aurantifolia* Christm. Swing.) และ Mandarin (*C. reticulata* Blanco.) พันธุ์ Monica ที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง อายุ 3 เดือน ในอาหารสูตร MS เติมวิตามินของสูตร B5 น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ BA, KN, TDZ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ โดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนด้วยวิธีการต่างๆ เป็นเวลา 50 วัน พบว่า การเติม BA เข้มข้น 33.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 5.4 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างยอดรวมได้มากที่สุดในส้มทั้งสองชนิด คือ 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 3.38 และ 2.96 ยอด ตามลำดับ และพบว่าวิธีการวางเลี้ยงโดยการกรีดลำต้นตามยาวและวางเลี้ยงในแนวนอนบนอาหาร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดในส้มทั้งสองชนิด คือ 7.77 และ 5.12 ยอด ตามลำดับ

3. การชักนำราก

Kitto และ Young (1981) ชักนำรากจากยอดส้ม Carrizo citrange ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลสำเร็จ 80 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนรากต่อยอด 10.2 ราก ในขณะที่ให้ผลสำเร็จ 80 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนรากต่อยอด 5-9 ราก เมื่อเติม NAA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (Barlass and Skene, 1982)

Edriss และ Berger (1984) ชักนำรากจากยอดส้ม Troyer citrange ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ดี

Sim และคณะ (1989) ชักนำรากจากยอดส้ม *C. mitis* Blanco โดยตัดยอดที่มีความยาว 1.5-2 เซนติเมตร เลี้ยงแบบสะพานในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม IBA (indolebutyric acid) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้ 66 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากต่อยอด 2.4 ราก

Beloauly (1991) ชักนำรากจากยอดส้ม *C. aurantium*, *P. trifoliata* และ Carrizo citrange ในอาหารสูตร MT เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลสำเร็จ 20, 32 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Raman และคณะ (1992) ชักนำรากจากยอดส้ม *C. limon* และ *C. jambhiri* ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างรากได้ดีที่สุด มีความยาวราก 4-6 เซนติเมตร และเมื่อย้ายปลูกลงดินมีชวิตรอด 40 เปอร์เซ็นต์

Gill และคณะ (1994) ชักนำรากจากยอดส้มพันธุ์ Kinnow mandarin ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากมากที่สุด 7 ราก ความยาวราก 3.3 เซนติเมตร และเมื่อย้ายปลูกลงดินมีชวิตรอด 31.2 เปอร์เซ็นต์

Singh และคณะ (1994) ชักนำรากจากยอดส้ม *C. reticulata* Blanco และ *C. limon* Burm.F. โดยตัดยอดที่มีความยาว 2 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากในส้มทั้งสองชนิดได้ 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวนราก 4.3 และ 4.9 ราก ตามลำดับ

Gill และคณะ (1995) ชักนำรากจากยอดส้มพันธุ์ Local sangtra ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ย 4.5 ราก แต่อาหารที่ความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากมากที่สุด 4.8 เซนติเมตร

Goh และคณะ (1995) ชักนำรากจากยอดส้มโอที่สร้างจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม IBA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ สามารถสร้างรากเฉลี่ยได้มากที่สุด 1.3 และ 1 ราก ตามลำดับ ส่วนอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนรากเฉลี่ยของยอดที่สร้างจากปลายยอดได้มากที่สุด 1.4 ราก

Tapiti และคณะ (1995) ชักนำรากจากยอดส้ม orange พันธุ์ Mosambi ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA และ IBA ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลสำเร็จ 70 เปอร์เซ็นต์

Harada และ Murai (1996) ชักนำรากจากยอดส้ม *P. trifoliata* ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม IBA เข้มข้น 0.5 หรือ 5 ไมโครโมลาร์ ให้ผลสำเร็จ 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 2.2 และ 2.3 ราก ตามลำดับ

Balch และ Alejo (1997) ชักนำรากจากยอด Mexican lime และ Mandarin ที่มีความยาว 8 มิลลิเมตร ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งเติม NAA เข้มข้น 2.7 และ 5.4 ไมโครโมลาร์ หรือ IBA เข้มข้น 2.5 และ 4.9 ไมโครโมลาร์ พบว่า ส้มทั้งสอง

ชนิดและทุกความเข้มข้นของ NAA หรือ IBA ให้การสร้างราก จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวราก ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 70 เปอร์เซ็นต์ 2.9 ยอด และ 10-40 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อย้ายปลูกลงดิน มีชีวิตรอดประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์

4. การปลูกถ่ายยีนในส้ม

อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืชพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน สร้างความเสียหายให้กับพืชใบเลี้ยงคู่โดยทำให้เกิดโรคปุ่มปมบริเวณบาดแผลที่เข้าทำลาย การเกิดโรคปุ่มปมพบว่าเกิดจาก DNA บางส่วนบน Ti plasmid คือ T-DNA (transfer DNA) ของอะโกรแบคทีเรียมีการถ่ายทอดเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช (Kosuge *et al.*, 1982) ต่อมาจึงได้พยายามนำส่วนของ T-DNA มาใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืช เช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนทนแล้ง ยีนที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอทธีลีน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536) Ti plasmid มีอยู่ 2 ชนิด ตามโอไพน์ที่สร้างขึ้น คือ พลาสมิดชนิดออคโทไพน์ มียีนควบคุมการสร้างออคโทไพน์ (*Ocs*) อะโกรไพน์ (*Agr*) และพลาสมิดชนิดโนพาไลน์ มียีนควบคุมการสร้างโนพาไลน์ (*Nos*) และอะโกรซิโนไพน์ (*Acs*) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่า Ti plasmid มีส่วนประกอบของ T-DNA ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ซึ่งเป็นส่วนที่ถ่ายทอดเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชแล้วควบคุมการสร้างโอไพน์ ตามชนิดของ Ti plasmid และอีกส่วนหนึ่งคือ virulent gene (*Vir*) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช สำหรับส่วนอื่นเป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุล T-DNA ที่ส่งถ่ายไปยังพืชเกิดการรวมอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536) การเคลื่อนย้ายของ T-DNA ถูกกำหนดขอบเขตโดยลำดับเบสที่ซ้ำกัน 2 ข้าง คือแขนด้านซ้ายและแขนด้านขวาข้างละประมาณ 25 คู่เบส (Alt *et al.*, 1990) นอกจากนี้กลไกการเคลื่อนย้าย T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียไปยังพืชอาศัยควบคุมโดยกลุ่ม *Vir* gene บน Ti plasmid กลุ่มยีนเหล่านี้ ประกอบด้วยยีนที่มีหน้าที่ต่างๆ เช่น ยีน *Vir* A มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการจดจำสารประกอบ พวกฟีนอลอะซิโตไชริงกอน (สารที่พืชสร้างขึ้นป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคเมื่อเกิดบาดแผล) ยีน *Vir* D ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ T-DNA ตรงตำแหน่งแขนด้านขวาและแขนด้านซ้ายให้ T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) พร้อมส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชโดยเริ่มจากปลายแขนด้านขวาไปเรื่อยๆ เมื่อ T-DNA เข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชจึงมีการแสดงออกของยีนที่อยู่บนส่วนของ T-DNA (Alt *et al.*, 1990; Steck *et al.*, 1990)

Moore และคณะ (1989) อ้างโดย Gmitter และคณะ (1992) เป็นผู้เริ่มการทดลองปลูกถ่ายยีนในส้มโดยใช้อะโกรแบคทีเรียกับชิ้นส่วนลำต้นจากต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลอง และส่วนใหญ่มีการทดลองกับส้ม Carrizo citrange เพราะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในหลอดทดลองได้ดี ทั้งต้นอ่อนที่พัฒนาจากเซลล์นิวเซลล่าและจากการผสมพันธุ์ ชิ้นส่วนลำต้นที่ใช้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ

EHA101 ที่มีพลาสมิด pMON9793 มียีนคัดเลือก neomycin phosphotransferase II (*Npt* II) และการตรวจสอบ β-glucoronidase (GUS) บนรอยตัดของชิ้นส่วน เลี้ยงร่วมกับเชื้อ 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเติมสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองใช้คาร์เบนนิซิลิน พบว่า มีผลยับยั้งการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้น จึงทดลองใช้ซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดีและไม่มีผลต่อการสร้างยอดรวม หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเติมสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน คือ คานามัยซิน ซึ่งในการทดลองใช้ความเข้มข้นประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า มีการสร้างยอดรวมในอาหารคัดเลือก 25 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกิจกรรมของ GUS เมื่อย้ายปลูกลงดินสามารถมีชีวิตรอดและจากการตรวจสอบพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่ปลูกถ่าย และต่อมา Moore และคณะ (1992) ทดลองปลูกถ่ายยีนในส้มสามชนิด คือ Carrizo citrange, Swingle citrumelo (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata*) และ Key lime โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายเชื้อเดียวกัน วิธีการปลูกถ่ายยีนโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นส้มที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2-4 เดือน ความยาว 1 เซนติเมตร ในแนวตั้งโดยวางด้านโคนหรือปลายสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนชิ้นส่วนลำต้นที่วางโผล่พ้นอาหาร วางเลี้ยง 2-3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมจนกระทั่งกำจัดเชื้อแบคทีเรียหมดแล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง 4-8 สัปดาห์ ตัดฐานยอดและลำต้นเดิมนำไปทดสอบการปลูกถ่ายยีนส่วนปลายยอดนำไปชักนำรากในอาหารสูตร MT เติม NAA ความเข้มข้นต่างๆ จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนมีประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ในกรณีลำต้นเดิมที่หยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียในส้ม Carrizo citrange ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *GUS* มากที่สุด 8.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือส้ม Swingle และ Key lime ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *GUS* 4.9 และ 3.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยอดใหม่ที่พัฒนาจากชิ้นส่วนลำต้นที่หยดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่า ในกรณีการวางเลี้ยงให้ด้านปลายสัมผัสอาหารในส้ม Carrizo citrange ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *GUS* มากที่สุด 2.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Swingle และ Key lime ที่วางเลี้ยงให้ด้านโคนสัมผัสอาหารซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *GUS* 0.4 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยอดใหม่ส้ม Carrizo citrange ที่มีการแสดงออกของ *GUS* สามารถสร้างรากได้ดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายปลูกลงดินมีชีวิตรอดและเมื่อตรวจสอบพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่ปลูกถ่าย

Pena และคณะ (1995a) ทดลองปลูกถ่ายยีนในส้ม Carrizo citrange ด้วย *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 มีพลาสมิด p35SGUSINT มียีน neomycin phosphotransferase II (*Npt* II) ต้านทานต่อคานามัยซินใช้เป็นตัวคัดเลือก β-glucuronidase (*GUS*) เป็นตัวตรวจสอบผล วิธีการปลูกถ่ายยีนโดยการตัดชิ้นส่วนลำต้นจาก

ต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 5 สัปดาห์ ให้มีความยาว 1 เซนติเมตร จุ่มในเชื้ออะโกรแบคทีเรียความหนาแน่น $4x10^7$ และ $4x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวางเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นในแนวตั้งบนอาหารสูตรเดียวกันแล้วหยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนชิ้นส่วนลำต้นที่โผล่พ้นอาหาร วางเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และแวนโคมัยซิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1-4 เดือน ตัดยอดใหม่ที่สร้างจากชิ้นส่วนลำต้นไปทดสอบกิจกรรมของ *GUS* และส่วนปลายยอดที่เหลือนำมาเสียบยอดบนต้นกล้าส้ม Troyer citrange ในหลอดทดลอง วางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำยอดไปเสียบอีกครั้งบนส้ม Rough lemon (*C. jambhiri* Lush) ในโรงเรือน จากการทดลองพบว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียความหนาแน่น $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงร่วมกับเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนลำต้นในเชื้อแล้ววางเลี้ยงในแนวนอนบนอาหาร มีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนสูง 20.6 เปอร์เซ็นต์ ยอดใหม่ที่สร้างขึ้นมีการแสดงกิจกรรมของ *GUS* 55.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำยอดใหม่ที่นำไปเสียบบนต้นตอมาตรวจพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่ปลูกถ่าย และในปีเดียวกัน Pena และคณะ (1995b) ได้ทดลองปลูกถ่ายยีนในส้ม Sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ด้วยอะโกรแบคทีเรียสายเชื้อเดียวกันแต่ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในโรงเรือน ฟอกฆ่าเชื้อ ตัดให้มีความยาว 0.5-1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากหยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียความหนาแน่น $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนชิ้นส่วนลำต้นที่วางโผล่พ้นอาหาร แล้ววางเลี้ยง 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันแต่เพิ่มความเข้มข้นซีโฟทาซิมเป็น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำตามวิธีการเดียวกันดังที่กล่าวข้างต้น จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนมีประมาณ 10.3 เปอร์เซ็นต์ และได้ส้มพันธุ์จำลอง 10 ต้นที่สามารถย้ายปลูกลงดินมีชีวิตรอดเมื่อตรวจสอบมีการแสดงออกของยีนที่ปลูกถ่าย

นอกจากนี้มีรายงานการทดสอบสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดแต่ละชนิดใช้ 4 ความเข้มข้นคือ 100, 200, 400, 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 และ LBA4404 และทดสอบผลต่อการสร้างแคลลัสจากแผ่นใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พันธุ์ Xanthi สำหรับวัตถุประสงค์แรกดูดเชื้ออะโกรแบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YEB วางกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจุ่มสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นต่างๆ วางทับบนอาหารวางเลี้ยง 24 ชั่วโมง วัดระยะทางการเจริญของเชื้อ พบว่าซีโฟทาซิมสามารถกำจัดเชื้อ สายเชื้อ LBA4404 ได้ดีที่สุด ส่วนโมซาแลคแทมสามารถกำจัดสายเชื้อ EHA101 ได้ดีที่สุด และวัตถุประสงค์ในการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ต่อการสร้างแคลลัสพบว่าซีโฟทาซิมและโมซาแลคแทมทุกความเข้มข้นมีผลน้อยมากต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสแต่การใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลต่อเวลาในการสร้างแคลลัส (Shackelford and Chlan, 1996)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน
2. เพื่อศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการฆ่าเชื้อและสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยง
3. เพื่อศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง
4. เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการปลูกถ่ายยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกับส้มโชกุนต่อไป

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุพืช

นำเมล็ดส้มโชกุนจากผลที่แก่เต็มที่ แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเมล็ด บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เวลา 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อใช้ชิ้นส่วนลำต้นและปลายยอดในการศึกษาพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่และการปลูกถ่ายยีนต่อไป

2. เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ในการปลูกถ่ายยีนให้กับส้มโชกุนผ่านอะโกรแบคทีเรีย ใช้อะโกรแบคทีเรีย 4 สายเชื้อ ดังนี้คือ

2.1 *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121

2.2 *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI121

2.3 *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121

2.4 *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTok233

สามสายเชื้อแรกมียีนต้านทานต่อคานามัยซินเป็นยีนเครื่องหมายและ GUS เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งหรือเหลวสูตร YEB (Yeast Extract Broth) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่สายเชื้อ EHA101 เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งหรือเหลวสูตร LB (Luria Broth) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสายเชื้อที่สี่มียีนต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน เป็นยีนเครื่องหมายและ GUS เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งหรือเหลวสูตร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

(โครงสร้างพลาสมิดและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวกที่ 2-7)

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองมีด้วยกันหลายชนิดคือ สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS, MT,(ภาคผนวกที่ 1) YEB , LB และ AB ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองคือ BA, KN, 2-iP, TDZ (thidiazuron) , NAA, IBA, GA_3 และสารอื่นๆ คือ น้ำตาลซูโครส วุ้นไฟต้าเจล และสารปฏิชีวนะชนิด คานามัยซิน ไฮโกรมัยซิน และซีโฟทาซิม สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS คือ เอ็กกลุ๊ก (X-Gluc) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ไดโซเดียมเอทธีลีนไดอะมีนเตตราอะซิเตท (Na_2EDTA) ติตรอน X-100 (Titron X-100) โซเดียมลอริลซาโคซินซัลเฟต (Sodium lauryl sakosine sulfate) และเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (β-mercaptoethanol)

4. อุปกรณ์

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องเขย่า
- เครื่องดูดสูญญากาศ
- เครื่องกรองพร้อมกระดาษมิลลิพอร์
- เครื่องมือผ่าตัด เช่น ด้ามมีด ใบมีด ปากคีบ
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- เครื่องดูดสารละลายปรับปริมาตรเป็นไมโครลิตร
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น จานเพาะเลี้ยง ขวดแก้ว ฟลาสค์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ปิเปต
- หม้อนึ่งความดัน ตู้อบไมโครเวฟ ตู้อบฆ่าเชื้อ ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ
- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

5. สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

5.1 อาหารเพาะเลี้ยงส้มโชกุน

5.1.1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ด ใช้สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือเติม BA เข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.1.2 สูตรอาหารชักนำยอดรวม ใช้สูตร MS หรือ MT เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไซโตไคนินชนิดต่างๆ คือ BA หรือ KN หรือ 2-iP หรือ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงลำพังหรือ

เติม NAA ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในกรณีการชักนำการยืดยาวของยอดเติม GA_3 เข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.1.3 สูตรอาหารชักนำราก ใช้สูตร MS หรือ MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 1, 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IBA เข้มข้น 0.5, 1, 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

5.2.1 อาหารแข็งและเหลวสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ *A. rhizogenes* สายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI121

5.2.2 อาหารแข็งและเหลวสูตร LB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121

5.2.3 อาหารแข็งและเหลวสูตร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTok233

5.3 อาหารเพาะเลี้ยงหลังการปลูกถ่ายยีน ใช้สูตร MT เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม 200, 250, 300, 350 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 0, 50, 100, 150, 200 , 250 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ ไฮโกรมัยซิน 0, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารทุกสูตรปรับ pH 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ยกเว้น GA_3 และสารปฏิชีวนะ ฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน เติมในอาหารขณะที่ยังอุ่นอยู่ (อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส)

6. การเตรียมอะโกรแบคทีเรียและการเลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนส้มโชกุน

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียแต่ละสายเชื้อ จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 5.2.1-5.2.3 ภายในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมอาหารฟลาสค์ละ 40 มิลลิลิตร วางภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลา 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง และปรับความหนาแน่นเป็น 1.2×10^7, 1.2×10^8, 1.2×10^{10}, 1.2×10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อที่ได้เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง โดยตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนรอยตัดของชิ้นส่วน เลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร 5.3

7. การตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

ตัดใบและเนื้อเยื่อบริเวณฐานยอดที่สร้างจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน ใส่จานหลุม (titer plate) 2-3 ชิ้นต่อหลุม เติมส่วนผสมของสารละลายเอ็กกลุ๊ก เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 26 ไมโครลิตร กับไลซีสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลุมละ 250 ไมโครลิตร นำไปดูดอากาศออกเพื่อให้สารละลายเข้าสู่เซลล์ด้วยเครื่องดูดสูญญากาศ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วใช้เมทธิลแอลกอฮอล์ล้างคลอโรฟิลล์ออก 3-4 ครั้ง ตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อที่เกิดจากปฏิกิริยาของ GUS กับ เอ็กกลุ๊ก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาผลของ BA ต่อการพัฒนาการของเมล็ดส้มโชกุน

ใช้เมล็ดวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 7.5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดต่อเมล็ดและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

2. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงวางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MS เติม BA หรือ KN หรือ 2-iP ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

2.2 การศึกษาผลของ BA และ TDZ ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอด จากต้นกล้าและตาข้างจากยอดใหม่ที่ชักนำในหลอดทดลอง วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MS เติม BA หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 0.7, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ

BA หรือ TDZ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

3. การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

3.1 การศึกษาผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอดจากต้นกล้าและตาข้างจากยอดใหม่ที่ชักนำในหลอดทดลอง วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MS หรือ MT เติม BA ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

3.2 การศึกษาผลของอาหารสูตร MT เติม BA และ NAA ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอดจากต้นกล้าและตาข้างจากยอดใหม่ที่ชักนำในหลอดทดลอง วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม BA และ GA_3 ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ BA และ NAA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

4. การศึกษาผลของ GA_3 ต่อการยืดยาวของยอด

ใช้ยอดรวมที่ชักนำในหลอดทดลอง วางเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลจำนวนใบต่อยอดและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ GA_3 โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ยอด

5. การศึกษาผลของ NAA และ IBA ต่อการสร้างราก

ใช้ยอดรวมที่ชักนำในหลอดทดลอง วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA ความเข้มข้น 1, 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IBA เข้ม

ข้น 0.5, 1, 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน ตรวจผลความสามารถในการสร้างราก จำนวนรากต่อยอด ความยาวรากและการมีชีวิตรอดหลังย้ายปลูกเปรียบเทียบในแต่ละความเข้มข้นของ NAA และหรือ IBA โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ยอด

6. การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

6.1 การศึกษาผลของซีโฟทาซิมต่อการฆ่าเชื้อและสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หยดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 บนรอยตัดของชิ้นส่วนเลี้ยงร่วมกับเชื้อ 48 ชั่วโมง ย้ายไปเลี้ยงในอาหาร เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม เข้มข้น 200, 250, 300, 350 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาการฆ่าเชื้อ หรือวางเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่างๆ เหมือนข้างต้น โดยไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ เพื่อศึกษาการสร้างยอดรวม ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลความสามารถในการฆ่าเชื้อและสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิม โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

6.2 การศึกษาผลของคานามัยซินต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซินเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของคานามัยซิน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

6.3 การศึกษาผลของไฮโกรมัยซินต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซิน

เข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลการสร้างยอดรวมเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

6.4 การศึกษาผลของคานามัยซินและซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซินเข้มข้น 50, 100, 150, 200 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟทาซิม เข้มข้น 200, 250, 300, 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลการสร้างยอดรวมเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของคานามัยซินและซีโฟทาซิม โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดแต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

7. การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

7.1 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยการคัดเลือกด้วยคานามัยซิน

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงวางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หยดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 บนรอยตัดของชิ้นส่วน วางเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200, 250, 300, 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซินเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และตรวจผลการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิมและคานามัยซินโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

7.2 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยการคัดเลือกด้วยไฮโกรมัยซิน

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หยดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 มีพลาสมิด pTok233 บนรอยตัดของชิ้นส่วน วางเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และตรวจผลการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ย

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

และความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

8. การศึกษาผลของความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีน

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ที่มีพลาสมิด pBI121 และสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ซึ่งปรับความหนาแน่น 1.2×10^{7}, 1.2×10^{8}, 1.2×10^{10}, 1.2×10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนรอยตัดของชิ้นส่วน สำหรับชุดเปรียบเทียบหยดด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรีย วางเลี้ยงเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร 3 สำหรับการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนในแต่ละสายเชื้อ ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลกิจกรรมของ GUS ความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นของสายเชื้อ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

9. การศึกษาผลของเวลาในการอินคิวเบทเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีน

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่อินคิวเบทเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บนรอยตัดของชิ้นส่วน สำหรับชุดเปรียบเทียบหยดด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรีย วางเลี้ยง 48 ชั่วโมง ย้ายไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร 3 เพื่อคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนแต่ละสายเชื้อ ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลกิจกรรมของ GUS ความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยเปรียบเทียบกันในแต่ละเวลาอินคิวเบทเชื้อ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

10. การศึกษาผลของวิธีการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีน

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 0.5-0.7 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ที่มีพลาสมิด pBI121 และสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ที่มีความหนาแน่นเหมาะสมที่สุดจากการศึกษาที่ 8 โดยวิธีการหยดเชื้อบนรอยตัดของชิ้นส่วนหรือการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในเชื้อ 10 นาที สำหรับชุดเปรียบเทียบหยดและจุ่มแช่ด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรีย วางเลี้ยง 48 ชั่วโมง

ย้ายไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร 3 สำหรับการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนในแต่ละสายเชื้อ ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลการปลูกถ่ายยีนโดยกิจกรรมของ GUS ความสามารถในการสร้างยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเลี้ยงร่วม โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น

ทุกการทดลองวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เวลาให้แสง 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาผลของ BA ต่อการพัฒนาการของเมล็ดส้มโชกุน

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโชกุนในอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารปราศจาก BA ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติม BA ทุกความเข้มข้น การเพิ่มความเข้มข้น BA ทำให้การสร้างยอดลดลง (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาจำนวนยอดต่อเมล็ด พบว่า อาหารปราศจาก BA ให้ผลดีที่สุด โดยให้จำนวนยอดต่อเมล็ดมากที่สุด 2.05 ยอด แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการเติม BA เข้มข้น 2.5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความยาวยอด พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดมากที่สุด 1.19 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารปราศจาก BA (ตารางที่ 1) การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ทำให้ความยาวยอดลดลงและยอดมีลักษณะแคระแกรน (ภาพที่ 1)

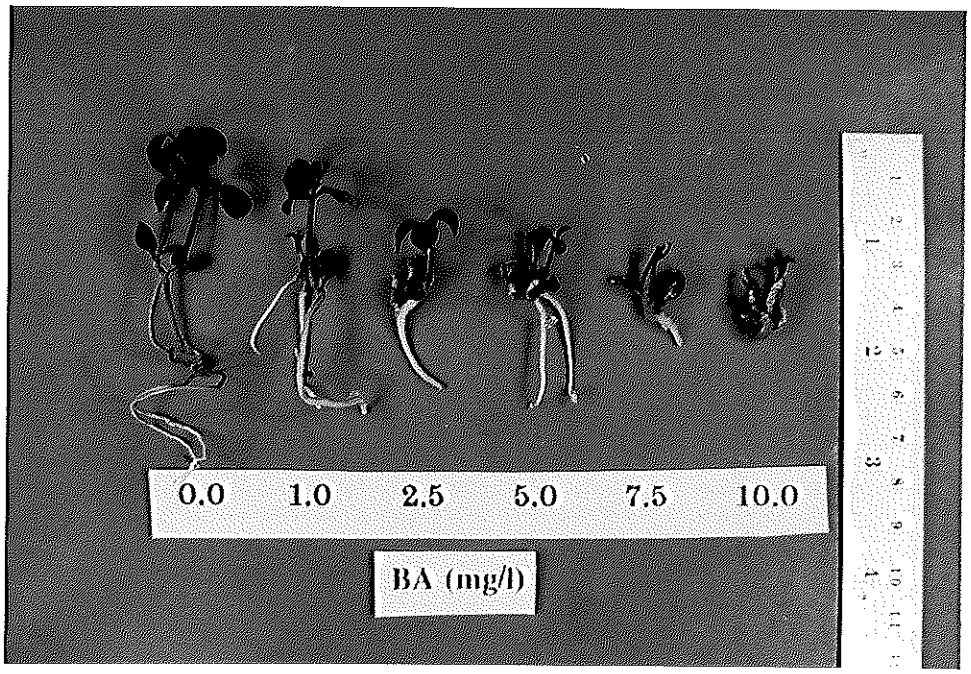
ตารางที่ 1 ผลของ BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการพัฒนาการของเมล็ดส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้น BA (มก./ล.)	การสร้างยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอดต่อเมล็ด	ความยาวยอด (ซม.)
0	100	2.05a	1.17a
1.0	93.33	1.80ab	1.19a
2.5	93.33	1.40b	0.86b
5.0	95.23	1.40b	0.71bc
7.5	93.33	1.43b	0.56c
10	88.88	1.43b	0.47c
F-test	ns	*	**
C.V. (%)	10.28	13.92	12.74

* และ ** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 1 ต้นกล้าที่ชักนำจากเมล็ดส้มโชกุนในอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างกัน

2. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

2.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยง

จากการทดลองชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน BA KN 2-iP ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ระหว่างไซโตไคนินที่ทดสอบ BA ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 58.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ KN และ 2-iP ชักนำยอดรวมได้ต่ำสุด (ตารางที่ 2) ส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินที่เหมาะสม พบว่า BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้ KN และ BA ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันหรือสูงกว่า รองลงมาคือ การใช้ BA และ KN เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ยอดรวมเท่ากัน 66.66 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ 2-iP เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดรวมต่ำสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ในทำนองเดียวกับจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน พบว่า อาหารเติม BA ให้จำนวนยอดรวมมากที่สุด 1.45 ยอด รองลงมาคือ KN และ 2-iP ซึ่งให้ยอดรวมเฉลี่ยเพียงยอดเดียว ความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสม 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.65 ยอด แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับการใช้ KN ความเข้มข้นอื่น ๆ และ 2-iP ทุกความเข้มข้นซึ่งชักนำยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนได้เพียงยอดเดียว (ตารางที่ 2 ภาพที่ 2) สำหรับความยาวยอดนั้นไซโตไคนินทุกชนิดและความเข้มข้นให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม KN และ 2-iP มีแนวโน้มให้ความยาวยอดสูงกว่า BA นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนและความยาวยอดที่สร้างมีความสัมพันธ์แบบผกผันซึ่งกันและกัน (ตารางที่ 2)

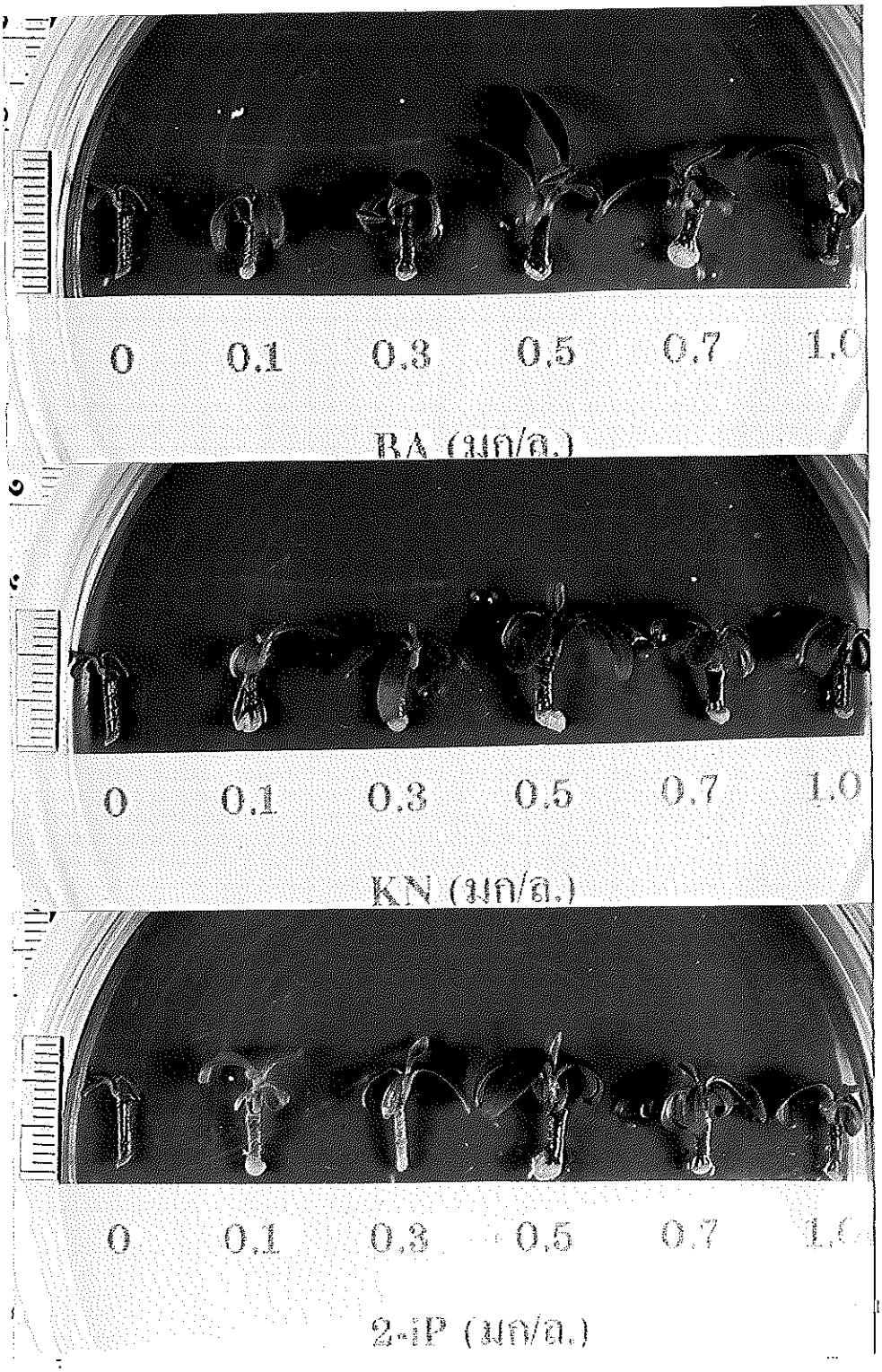
ตารางที่ 2 ผลของไซโตไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ไซโตไคนิน (มก./ล.)		การสร้างยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน	ความยาวยอด (ซม.)
	0	41.66bc	1.08bc	0.14
BA	0.1	58.33abc	1.28abc	0.13
	0.3	66.66ab	1.42ab	0.18
	0.5	75.00a	1.65a	0.18
	0.7	58.33abc	1.45ab	0.13
	1.0	50.00abc	1.29abc	0.12
เฉลี่ย		**58.33**	**1.36**	**0.14**
KN	0.1	50.00abc	1.16bc	0.20
	0.3	66.66ab	1.16bc	0.21
	0.5	41.66bc	1.27abc	0.18
	0.7	41.66bc	1.00c	0.19
	1.0	35.66bc	0.95c	0.16
เฉลี่ย		**46.22**	**1.10**	**0.18**
2-iP	0.1	58.33abc	1.00c	0.19
	0.3	41.66bc	1.00c	0.16
	0.5	41.66bc	1.16bc	0.15
	0.7	33.33c	1.00c	0.22
	1.0	31.00c	0.90c	0.14
เฉลี่ย		**41.27**	**1.02**	**0.16**
F-test		*	**	ns
C.V. (%)		24.27	13.18	29.05

* และ ** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

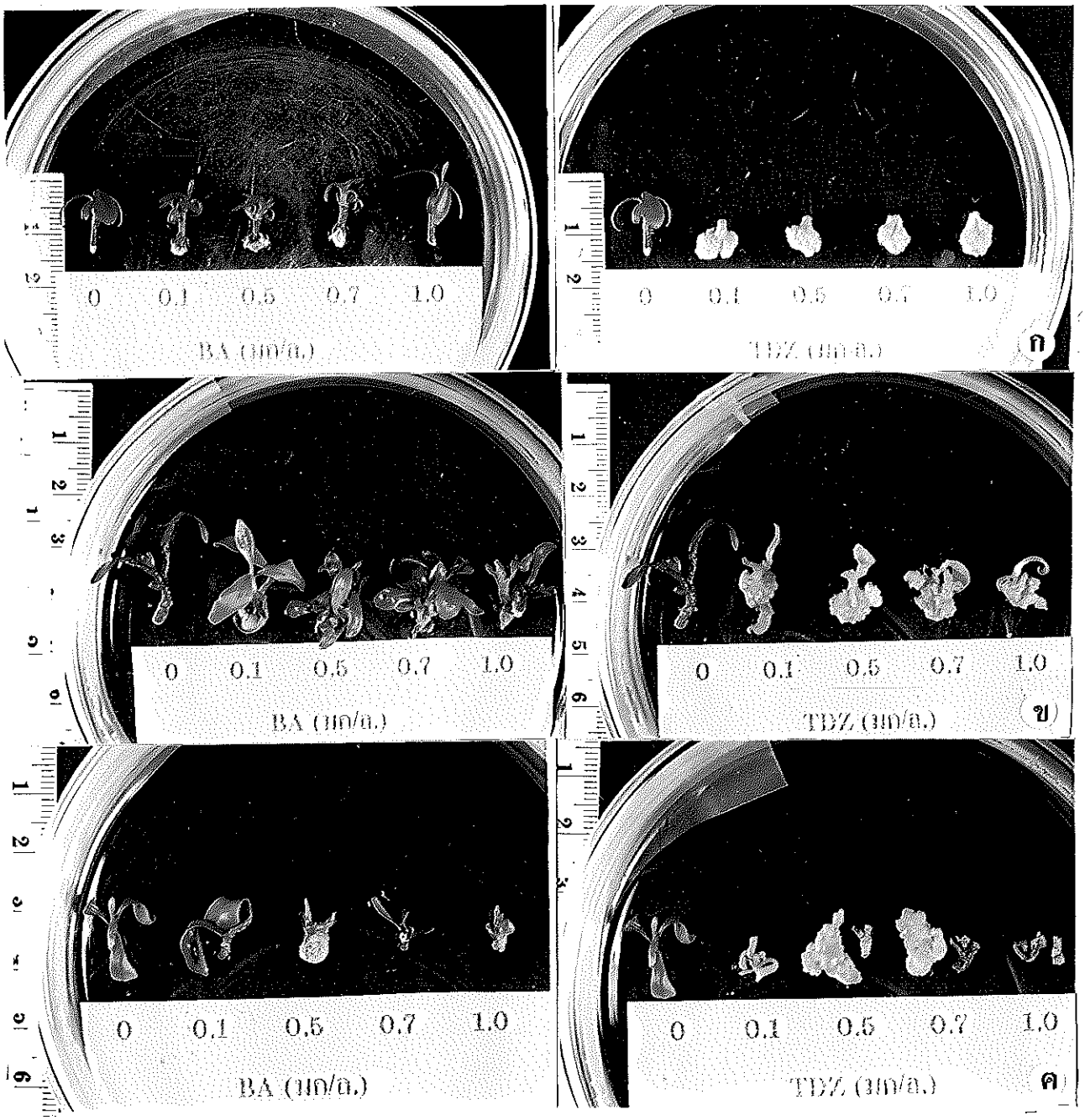


ภาพที่ 2 ยอดรวมที่ชักนำจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนในอาหารเติม BA หรือ KN หรือ 2-iP

2.2 การศึกษาผลของ BA หรือ TDZ ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอด จากต้นกล้าและตาข้างจากยอดใหม่สัมโชกุนที่ชักนำในหลอดทดลอง ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารเติม BA ให้การสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยจากทั้งสามชิ้นส่วน 60.90 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า TDZ ซึ่งให้การสร้างยอดรวมเพียง 11.66 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA พบว่า BA เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยจากทั้งสามชิ้นส่วนมากที่สุด 64.40 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อแยกพิจารณาความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดรวมในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดได้มากที่สุด 96.00 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับการเติม TDZ ทุกความเข้มข้น และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 78.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารเติม TDZ ไม่มีการสร้างยอดรวมแต่มีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนชิ้นส่วนที่สัมผัสอาหาร (ภาพที่ 3) และอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนตาข้างได้มากที่สุด 40.00 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับการเติม BA หรือ TDZ และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยของแต่ละชิ้นส่วนในอาหารเติม BA พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีการสร้างยอดรวมได้มากที่สุด 91.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และตาข้าง ซึ่งมีการสร้างยอดรวม 72.49 และ 18.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารเติม BA ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยจากทั้งสามชิ้นส่วน 1.44 ยอด มากกว่า TDZ ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 0.48 ยอด และเมื่อพิจารณาความเข้มข้น BA พบว่า BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยจากทั้งสามชิ้นส่วนมากที่สุด 1.76 ยอด เมื่อแยกพิจารณาความเข้มข้นของ BA ต่อการให้จำนวนยอดเฉลี่ยในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนปลายยอด ลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้างมากที่สุด 2.33, 1.87 และ 1.10 ยอด ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับ BA ความเข้มข้นอื่น ๆ และ TDZ ทุกความเข้มข้น ยกเว้นตาข้าง และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างยอดเฉลี่ยในแต่ละชิ้นส่วนในอาหารเติม BA พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีการสร้างยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.86 ยอด รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และตาข้าง ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.58 และ 0.88 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 3 ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุนในอาหารเติม BA หรือ TDZ

ก = ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยง ข = ยอดรวมจากปลายยอด ค = ยอดรวมจากตาข้าง

ตารางที่ 3 ผลของ BA หรือ TDZ ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

TDZ (มก./ล.)	BA	เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
-	-	72.22a	70.00b	40.00a	**60.74**
-	0.1	77.50a	90.00a	12.50c	**60.00**
-	0.5	78.48a	90.00a	12.50c	**60.31**
-	0.7	72.22a	96.00a	25.00b	**64.40**
-	1.0	61.78b	90.00a	25.00b	**58.92**
เฉลี่ย		**72.49**	**91.50**	**18.75**	**60.90**
0.1	-	0.00c	40.00c	12.50c	**17.50**
0.5	-	0.00c	12.50d	12.50c	**8.33**
0.7	-	0.00c	37.50c	12.50c	**16.66**
1.0	-	0.00c	12.50d	0.00d	**4.16**
เฉลี่ย		**0.00**	**25.62**	**9.37**	**11.66**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		5.07	9.97	16.61	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 ผลของ BA หรือ TDZ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

TDZ (มก./ล.)	BA	จำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
-	-	1.12e	1.09d	1.00a	**1.04**
-	0.1	1.73b	1.57c	1.00a	**1.43**
-	0.5	1.87a	2.33a	1.10a	**1.76**
-	0.7	1.49c	1.85b	0.77b	**1.37**
-	1.0	1.26d	1.72bc	0.66b	**1.21**
เฉลี่ย		**1.58**	**1.86**	**0.88**	**1.44**
0.1	-	0.00c	1.00d	1.00a	**0.66**
0.5	-	0.00c	0.95d	0.66b	**0.53**
0.7	-	0.00c	0.92d	0.47c	**0.46**
1.0	-	0.00c	0.85	0.00d	**0.28**
เฉลี่ย		**0.00**	**0.93**	**0.53**	**0.48**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		3.16	4.96	6.75	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

ในกรณีของความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารเติม BA ให้ความยาวยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วน 0.24 เซนติเมตร มากกว่า TDZ ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ย 0.09 เซนติเมตร โดยอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 0.28 เซนติเมตร เมื่อแยกพิจารณาความเข้มข้นของ BA ต่อการให้ความยาวยอดเฉลี่ยของยอดใหม่จากแต่ละชิ้นส่วน พบว่า อาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนปลายยอดมากที่สุด 0.41 เซนติเมตร ส่วน BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงมากที่สุด 0.26 เซนติเมตร ในขณะที่ BA เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างมากที่สุด 0.20 เซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดในแต่ละชิ้นส่วนในอาหารเติม BA พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด

0.33 เซนติเมตร รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง ซึ่งมีความยาวยอดเฉลี่ย 0.21 และ 0.18 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของ BA หรือ TDZ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของยอดที่สร้างจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

TDZ (มก./ล.)	BA	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ที่สร้างจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
-	-	0.22ab	0.41a	0.15abc	**0.28**
-	0.1	0.21ab	0.35ab	0.19a	**0.25**
-	0.5	0.14b	0.33bc	0.18ab	**0.21**
-	0.7	0.23ab	0.38ab	0.20a	**0.27**
-	1.0	0.26a	0.28cd	0.18ab	**0.24**
เฉลี่ย		**0.21**	**0.33**	**0.18**	**0.24**
0.1	-	0.00c	0.25d	0.08d	**0.11**
0.5	-	0.00c	0.28cd	0.12bcd	**0.13**
0.7	-	0.00c	0.24d	0.10cd	**0.11**
1.0	-	0.00c	0.10e	0.00e	**0.03**
เฉลี่ย		**0.00**	**0.21**	**0.07**	**0.09**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		21.86	6.77	12.95	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

3. การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

3.1 การศึกษาผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอด จากต้นกล้า และตาข้าง จากยอดรวมส้มโชกุนที่ชักนำในหลอดทดลอง ในอาหารสูตร MS หรือ MT เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารสูตร MT ให้การสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยจากทั้งสามชิ้นส่วนได้ 54.27 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้การสร้างยอดรวม 46.81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA พบว่า อาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยจาก 3 ชิ้นส่วนมากที่สุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อแยกพิจารณาความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างยอดรวมในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า อาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอด และลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 85 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนตาข้างได้มากที่สุด 58.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับ BA ความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างยอดรวมของแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีการสร้างยอดรวมได้มากที่สุด 68.29 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง ซึ่งมีการสร้างยอดรวม 62.47 และ 38.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน พบว่า อาหารสูตร MT ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยจาก 3 ชิ้นส่วน 1.73 ยอด มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.45 ยอด เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA พบว่า อาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนมากที่สุด 2.17 แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า อาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนปลายยอดได้มากที่สุด 2.77 ยอด ส่วน BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 2 ยอด และ BA เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนตาข้างได้มากที่สุด 2 ยอด และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างยอดเฉลี่ยจากแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดสร้างยอดได้มากที่สุด 2.24 ยอด รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง ซึ่งมีการสร้างยอด ได้ 1.59 และ 1.46 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 7 ภาพที่ 4)

ตารางที่ 6 ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วน			เฉลี่ย
		ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	
MS	0	41.66c	28.50e	33.33d	**34.49**
	0.1	57.40abc	30.83e	30.33dc	**39.52**
	0.3	59.99abc	54.64cd	58.33a	**57.59**
	0.5	66.66ab	47.50d	33.33d	**49.16**
	0.7	55.55abc	61.78bc	50.00b	**55.77**
	1.0	50.00bc	55.83cd	27.33e	**44.38**
เฉลี่ย		**55.21**	**46.51**	**38.77**	**46.81**
MT	0	50.00bc	35.00e	41.00c	**42.00**
	0.1	58.33abc	72.50b	30.33dc	**53.72**
	0.3	66.66ab	72.50b	33.33d	**57.49**
	0.5	75.00a	85.00a	30.00de	**63.33**
	0.7	66.66ab	84.75a	30.00de	**60.47**
	1.0	58.22abc	60.00c	27.66e	**48.62**
เฉลี่ย		**62.47**	**68.29**	**32.05**	**54.27**
F-test		*	**	**	
C.V. (%)		17.82	6.05	4.84	

* และ ** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

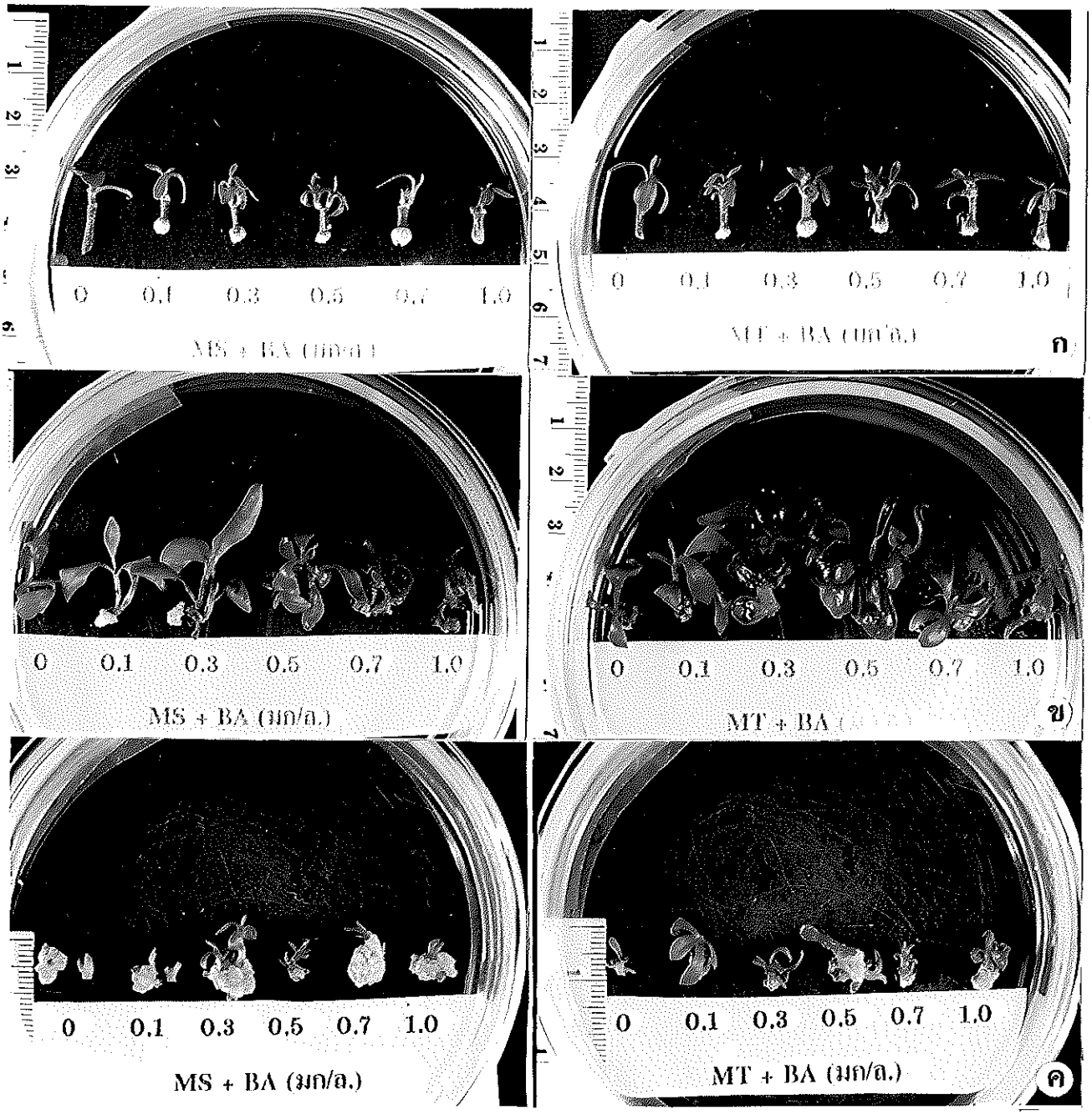
ตารางที่ 7 ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อการสร้างจำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนต่างๆ ต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
MS	0	1.08	1.08g	1.16bc	**1.10**
	0.1	1.48	1.26f	1.00c	**1.24**
	0.3	1.43	2.06cd	1.46bc	**1.65**
	0.5	1.77	2.12c	1.16bc	**1.68**
	0.7	1.48	1.97cd	1.30bc	**1.58**
	1.0	1.25	1.95d	1.20bc	**1.46**
เฉลี่ย		**1.41**	**1.74**	**1.21**	**1.45**
MT	0	1.16	1.30f	1.00c	**1.15**
	0.1	1.50	1.63e	1.62ab	**1.58**
	0.3	1.66	2.77a	1.25bc	**1.89**
	0.5	2.00	2.63a	1.50bc	**2.04**
	0.7	1.83	2.68a	2.00a	**2.17**
	1.0	1.42	2.47b	1.43bc	**1.60**
เฉลี่ย		**1.59**	**2.24**	**1.46**	**1.73**
F-test		ns	**	**	
C.V. (%)		24.33	2.52	9.87	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 4 ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารสูตร MS หรือ MT เติม BA ความเข้มข้นต่างกัน

ก = ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยง ข = ยอดรวมจากปลายยอด ค = ยอดรวมจากตาข้าง

ในกรณีความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารสูตร MT ให้ความยาวยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนได้ 0.25 เซนติเมตร มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ย 0.24 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA พบว่า อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนมากที่สุด 0.33 เซนติเมตร แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนปลายยอดได้มากที่สุด 0.41 เซนติเมตร ส่วนอาหารสูตร MT ที่ปราศจาก BA ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 0.38 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS ที่ปราศจาก BA ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนตาข้างได้มากที่สุด 0.33 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดให้ยอดที่มีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด 0.28 เซนติเมตร รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และตาข้าง ซึ่งมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากัน คือ 0.25 เซนติเมตร (ตารางที่ 8)

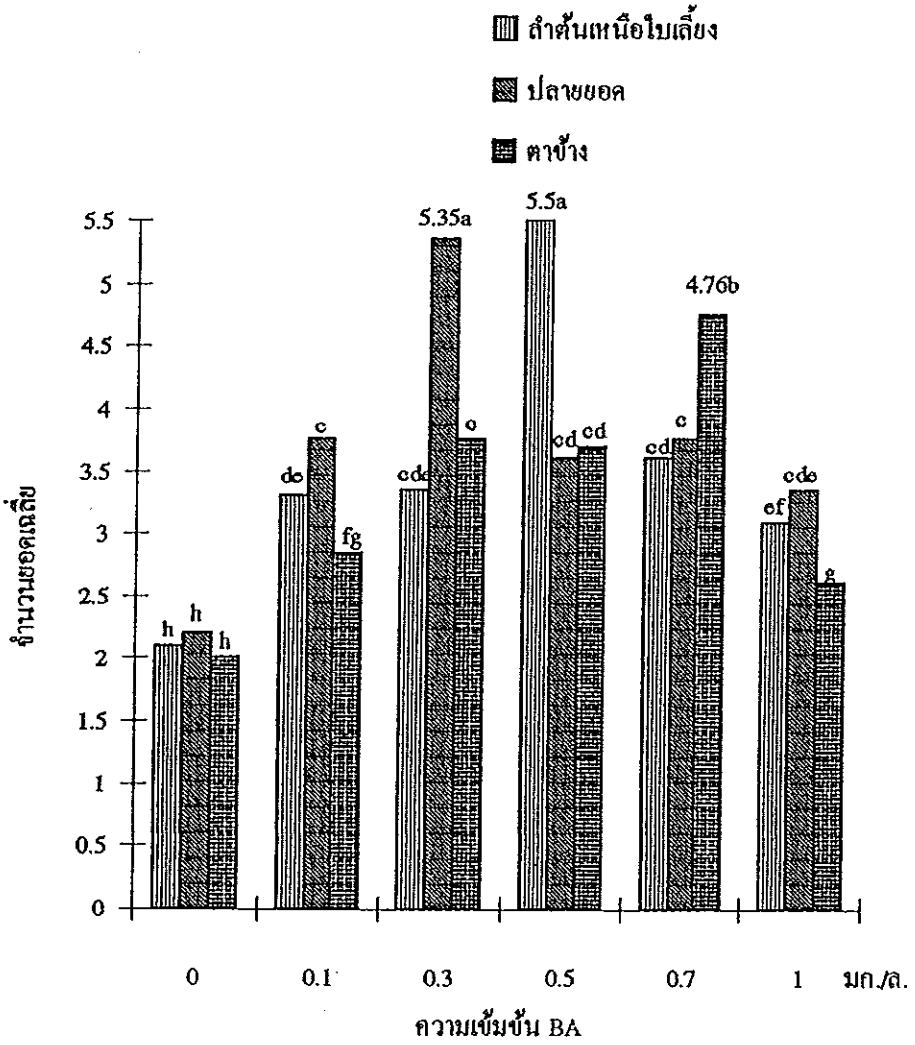
ตารางที่ 8 ผลของสูตรอาหารและความเข้มข้นของ BA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	BA (มก./ล.)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ที่สร้างจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
MS	0	0.18bc	0.21e	0.33a	0.24
	0.1	0.27abc	0.41a	0.31a	0.33
	0.3	0.28ab	0.33ab	0.27b	0.29
	0.5	0.21bc	0.31bcd	0.22c	0.24
	0.7	0.15c	0.24cde	0.20cd	0.19
	1.0	0.17bc	0.23de	0.19cd	0.19
เฉลี่ย		**0.21**	**0.28**	**0.25**	**0.24**
MT	0	0.38a	0.27bcd	0.22c	0.29
	0.1	0.27abc	0.26bcd	0.30ab	0.27
	0.3	0.24bc	0.25bcd	0.27b	0.25
	0.5	0.24bc	0.21e	0.20cd	0.21
	0.7	0.22bc	0.32abc	0.32a	0.28
	1.0	0.19bc	0.27bcd	0.17d	0.21
เฉลี่ย		**0.25**	**0.26**	**0.24**	**0.25**
F-test		*	**	**	
C.V. (%)		28.50	9.58	5.54	

* และ ** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

และจากการย้ายยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอด และตาข้างที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5, 0.3 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณยอดมากที่สุด 5.5, 5.35 และ 4.76 ยอด ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับ BA ความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 5 และ 6) ในกรณีความยาวยอด พบว่า ยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2.55 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับยอดรวมที่เลี้ยงในอาหารเติม BA ความเข้มข้นอื่นๆ ส่วนยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดรวมจากตาข้างที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2.01 และ 1.50 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

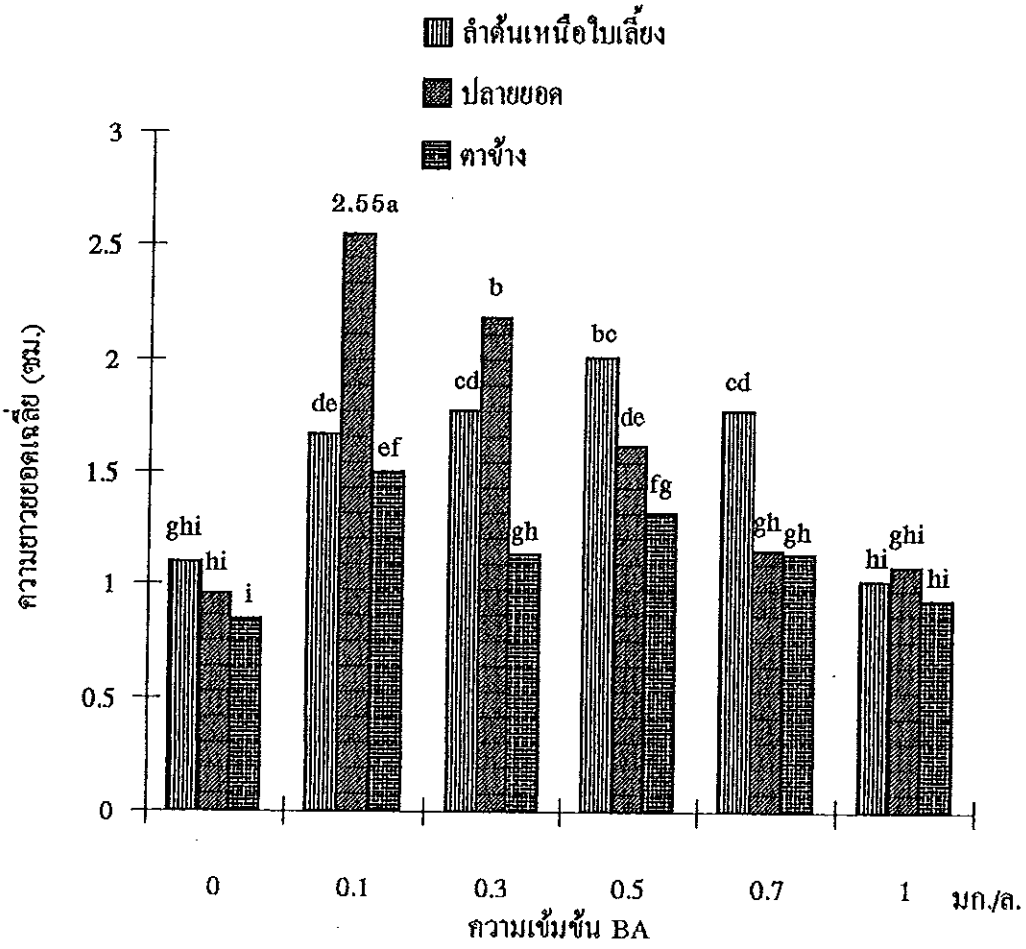


ภาพที่ 5 ผลของ GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน

ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

ภาพที่ 6 ยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุนที่เลี้ยงในอาหารเติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีกเป็นเวลา 1 เดือน

ก = ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยง ข = ยอดรวมจากปลายยอด ค = ยอดรวมจากตาข้าง



ภาพที่ 7 ผลของ GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อความยาวยอดจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน

ความยาวยอดเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

3.2 การศึกษาผลสูตรอาหาร MT เติม BA และ NAA ต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอด จากต้นกล้าส้มโชกุนและตาข้างจากยอดใหม่ที่ชักนำจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนในหลอดทดลอง ในอาหารสูตร MT เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนมากที่สุด 60.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA และ NAA ต่อการสร้างยอดรวมในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดได้มากที่สุด 97.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับ BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ ส่วน BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงมากที่สุด 72.50 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากตาข้างมากที่สุด 47.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับ BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างยอดรวมโดยเฉลี่ยจากแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดสร้างยอดรวมได้มากที่สุด 70.55 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง ซึ่งมีการสร้างยอดรวมได้ 48.89 และ 8.23 เซนติเมตร (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนได้มากที่สุด 1.46 ยอด เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA และ NAA ต่อการสร้างยอดรวมในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนปลายยอดมากที่สุด 2.70 ยอด ส่วน BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงมากที่สุด 1.55 ยอด และอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนตาข้างมากที่สุด 0.95 ยอด เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างยอดจากชิ้นส่วนต่างๆ พบว่า ปลายยอดมีการสร้างยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 1.77 ยอด รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และตาข้าง ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.22 และ 0.27 ยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 10 ภาพที่ 8)

ตารางที่ 9 ผลของ BA และ NAA ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

BA (มก./ล.)	NAA	เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
0	0	42.83de	47.50d	11.50c	**24.39**
0.25	0.1	55.83bc	80.83bc	0.00d	**45.55**
0.5	0.1	47.50cde	84.75b	0.00d	**49.08**
1.0	0.1	72.50a	85.00b	24.00b	**60.50**
2.5	0.1	55.83bc	97.50a	24.00b	**59.11**
5.0	0.1	64.16ab	47.50d	0.00d	**37.22**
0.5	0.25	27.50g	80.83bc	47.50a	**51.94**
1.0	0.25	64.16ab	97.50a	0.00d	**53.88**
2.5	0.25	54.83bcd	80.83bc	0.00d	**45.22**
5.0	0.25	53.75bcd	47.50d	0.00d	**33.75**
1.0	0.5	54.64bcd	47.50d	0.00d	**34.04**
2.5	0.5	30.83efg	72.50c	0.00d	**34.44**
5.0	0.5	39.92ef	47.50d	0.00d	**29.14**
เฉลี่ย		**48.89**	**70.55**	**8.23**	**42.55**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		7.20	5.05	14.49	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 10 ผลของ BA และ NAA ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

BA (มก./ล.)	NAA	จำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจาก ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
0	0	0.98d	1.15d	0.90a	**1.04**
0.25	0.1	1.26bc	2.45ab	0.00b	**1.23**
0.5	0.1	1.23bcd	2.70a	0.00b	**1.31**
1.0	0.1	1.53a	1.99abc	0.85a	**1.46**
2.5	0.1	1.23bcd	2.01abc	0.90a	**1.38**
5.0	0.1	1.22bcd	0.85d	0.00b	**0.69**
0.5	0.25	0.99d	2.05abc	0.95a	**1.33**
1.0	0.25	1.12bcd	1.85bc	0.00b	**0.99**
2.5	0.25	1.55a	1.85bc	0.00b	**1.13**
5.0	0.25	1.04cd	1.35cd	0.00b	**0.79**
1.0	0.5	1.31ab	2.35ab	0.00b	**1.22**
2.5	0.5	1.16bcd	1.35cd	0.00b	**0.83**
5.0	0.5	1.26bc	1.15d	0.00b	**0.80**
เฉลี่ย		**1.22**	**1.77**	**0.27**	**1.08**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		6.28	11.94	30.05	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

จำนวนยอดเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

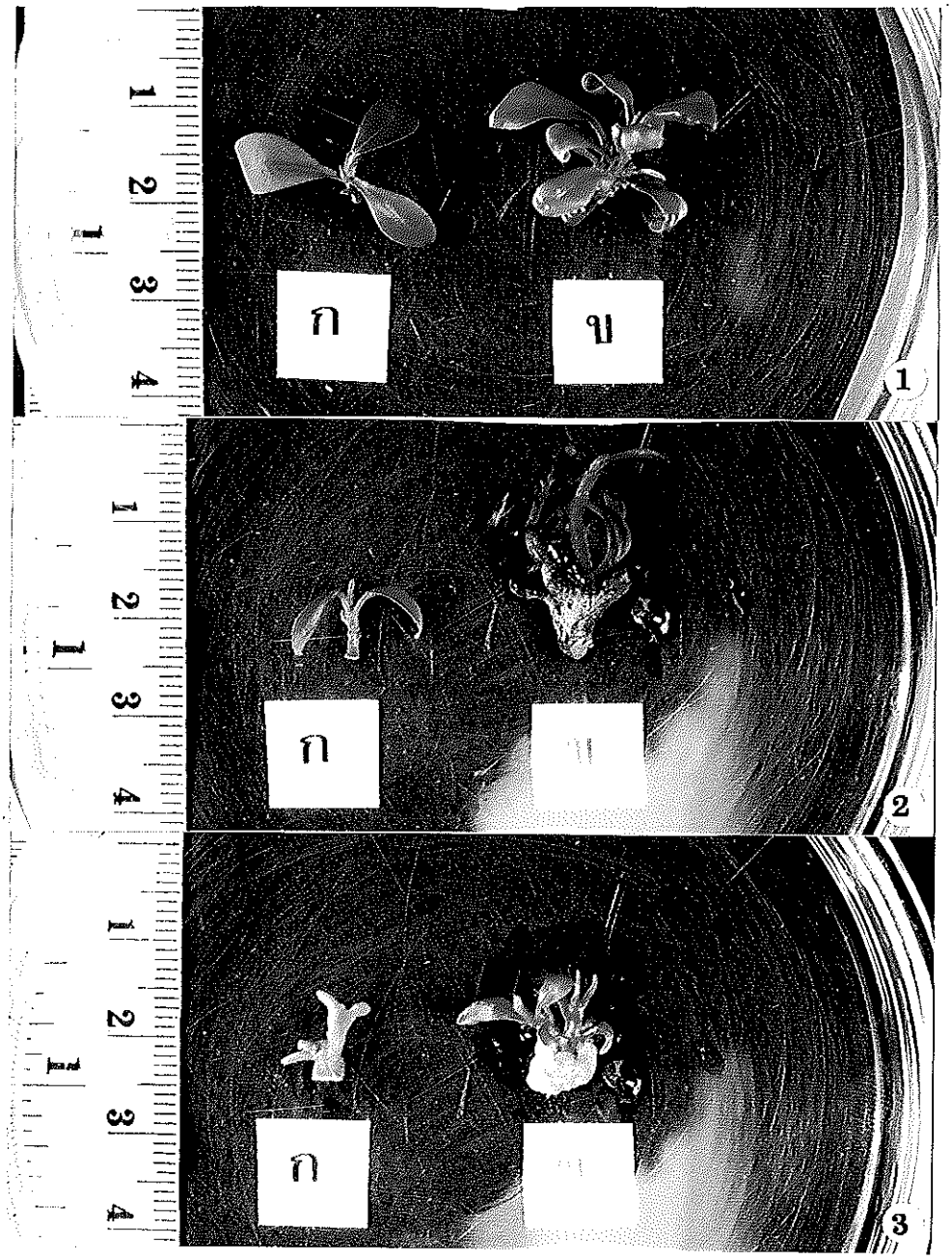
ในกรณีความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนได้มากที่สุด 0.33 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ BA และ NAA ต่อความยาวยอดในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากปลายยอดมากที่สุด 0.48 เซนติเมตร ส่วน BA เข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงมากที่สุด 0.36 เซนติเมตร และอาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยจากตาข้างมากที่สุด 0.28 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับ BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยจากแต่ละชิ้นส่วนพบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 0.27 เซนติเมตร รองลงมาคือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และปลายยอด ซึ่งมีความยาวยอดเฉลี่ย 0.20 และ 0.05 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของ BA และ NAA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

BA (มก./ล.)	NAA	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ที่สร้างจากชิ้นส่วน			
		ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
0	0	0.28b	0.25ef	0.23b	**0.25**
0.25	0.1	0.36a	0.48a	0.00d	**0.28**
0.5	0.1	0.36a	0.39bc	0.00d	**0.25**
1.0	0.1	0.30ab	0.42abc	0.28a	**0.33**
2.5	0.1	0.15de	0.24ef	0.09c	**0.16**
5.0	0.1	0.10e	0.14g	0.00d	**0.08**
0.5	0.25	0.24bc	0.21f	0.08c	**0.17**
1.0	0.25	0.21cd	0.35cd	0.00d	**0.18**
2.5	0.25	0.16de	0.24ef	0.00d	**0.13**
5.0	0.25	0.12e	0.23ef	0.00d	**0.11**
1.0	0.5	0.15de	0.30de	0.00d	**0.15**
2.5	0.5	0.12e	0.19fg	0.00d	**0.10**
5.0	0.5	0.10e	0.18fg	0.00d	**0.09**
เฉลี่ย		**0.20**	**0.27**	**0.05**	**0.17**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		10.26	7.48	20.42	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ความยาวยอดเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 8 ยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ในอาหารสูตร MT เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน

1 : ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยง ก = MT free hormone ข = BA 2.5 + NAA 0.25 มก./ล.

2 : ยอดรวมจากปลายยอด ก = MT free hormone ข = BA 0.5 + NAA 0.1 มก./ล.

3 : ยอดรวมจากตาข้าง ก = MT free hormone ข = BA 0.5 + NAA 0.25 มก./ล.

จากการย้ายยอดรวมที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มที่เลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ไปเลี้ยงในอาหารเติม BA และ GA_3 ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงและปลายยอดมีการเพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุดเท่ากัน 2.34 ยอด ส่วนยอดรวมจากชิ้นส่วนตาข้างมีการเพิ่มปริมาณยอดน้อยที่สุดเพียง 0.71 ยอด เมื่อพิจารณาการเพิ่มปริมาณยอดโดยเฉลี่ยจาก 3 ชิ้นส่วน พบว่า ยอดรวมจากอาหารเติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณยอดมากที่สุด 2.77 ยอด เมื่อแยกพิจารณาในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุด 5.90 ยอด แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับยอดรวมที่ชักนำจากอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ ส่วนยอดรวมจากปลายยอดที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุด 4.23 ยอด แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับยอดรวมจากอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ ในขณะที่ยอดรวมจากตาข้างที่ชักนำจากอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุด 4.40 ยอด แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับยอดรวมที่ชักนำจากอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 12) ในกรณีความยาวยอด พบว่า ยอดรวมที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดโดยเฉลี่ยจากทั้ง 3 ชิ้นส่วนมากที่สุด 1.23 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาความยาวยอดเฉลี่ยในแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.78 เซนติเมตร ส่วนยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.56 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับยอดรวมที่เลี้ยงในอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ และยอดรวมจากชิ้นส่วนตาข้างที่เลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.55 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับยอดรวมที่เลี้ยงในอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยจากแต่ละชิ้นส่วน พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดมีความยาวยอดเฉลี่ยรวมมากที่สุด 1.15 เซนติเมตร รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง ซึ่งมีความยาวยอดเฉลี่ย 1.11 และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ผลของ BA และ GA_3 ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน

BA (มก./ล.)	NAA	จำนวนยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
0	0	1.15f	1.30g	1.10d	1.18
0.25	0.1	1.40ef	2.58c	0.00e	1.32
0.5	0.1	1.23ef	3.00b	0.00e	1.41
1.0	0.1	1.65de	2.50c	1.40c	1.85
2.5	0.1	3.68b	2.23cde	2.40b	2.77
5.0	0.1	3.56b	1.90ef	0.00e	1.82
0.5	0.25	1.00f	2.40cd	4.40a	2.60
1.0	0.25	3.23b	2.00de	0.00e	1.74
2.5	0.25	2.56c	1.90ef	0.00e	1.48
5.0	0.25	5.90a	1.50fg	0.00e	2.46
1.0	0.5	1.32ef	2.55c	0.00e	1.29
2.5	0.5	1.90d	2.40cd	0.00e	1.43
5.0	0.5	1.90d	4.23a	0.00e	2.04
เฉลี่ย		**2.34**	**2.34**	**0.71**	**1.79**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		6.20	5.85	9.50	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 13 ผลของ BA และ GA_3 ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อความยาวยอดเฉลี่ยที่สร้างจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน ที่ผ่านเลี้ยงในอาหารเติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างกัน

BA (มก./ล.)	NAA	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ที่สร้างจากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง	ปลายยอด	ตาข้าง	เฉลี่ย
0	0	0.90d	0.95c	0.75c	**0.86**
0.25	0.1	1.56a	1.58a	0.00d	**1.04**
0.5	0.1	1.05bcd	1.78a	0.00d	**0.94**
1.0	0.1	1.15bc	1.00c	1.55a	**1.23**
2.5	0.1	1.25b	1.00c	1.10b	**1.11**
5.0	0.1	1.00cd	0.95c	0.00d	**0.65**
0.5	0.25	1.00cd	1.15bc	1.15b	**1.10**
1.0	0.25	1.25b	1.25b	0.00d	**0.83**
2.5	0.25	1.00cd	1.02bc	0.00d	**0.67**
5.0	0.25	1.25b	1.00c	0.00d	**0.75**
1.0	0.5	1.03bcd	1.10bc	0.00d	**0.71**
2.5	0.5	1.05bcd	1.17bc	0.00d	**0.74**
5.0	05	1.00cd	1.08bc	0.00d	**0.69**
เฉลี่ย		**1.11**	**1.15**	**0.35**	**0.87**
F-test		**	**	**	
C.V. (%)		6.14	6.43	21.70	

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

4. การศึกษาผลของ GA_3 ต่อการยืดยาวของยอด

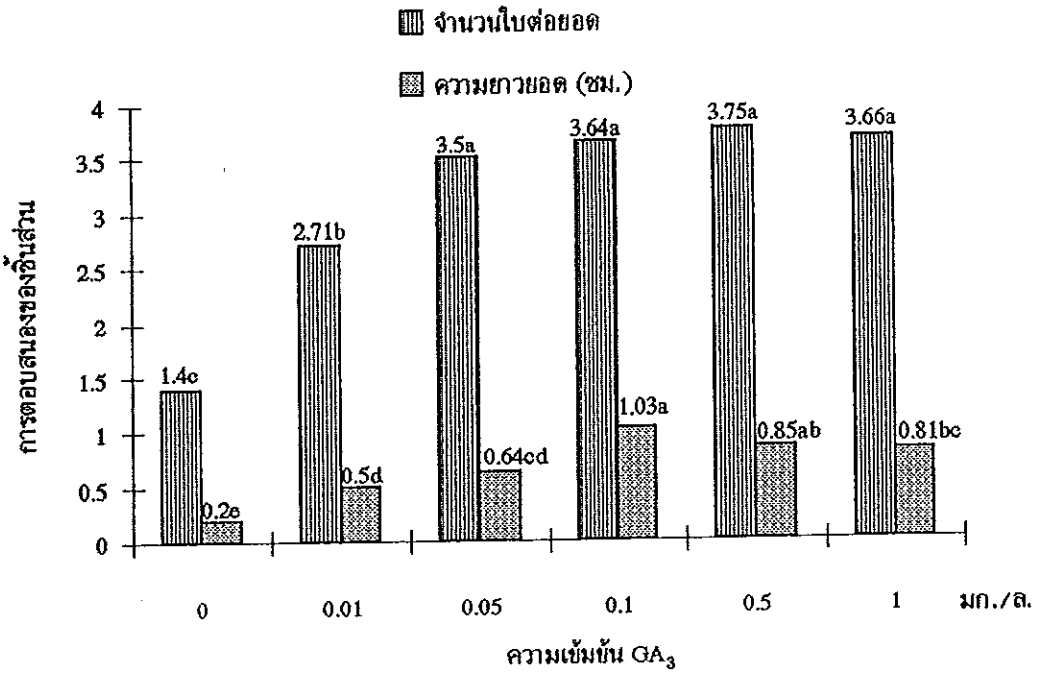
จากการเพาะเลี้ยงยอดส้มโชกุน ในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบต่อยอดมากที่สุด 3.75 ใบ ไม่แตกต่างทางสถิติกับ GA_3 เข้มข้น 0.05-0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 14 ภาพที่ 9) ส่วนกรณีความยาวยอดพบว่า GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดมากที่สุด 1.03 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ความยาวยอด 0.85 เซนติเมตร (ตารางที่ 14 ภาพที่ 9) การเติม GA_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดมีลักษณะเล็กผอม ใบเรียวเล็ก (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 14 ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆต่อการยืดยาวของยอดส้มโชกุน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยการวัดจำนวนใบและความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น

ความเข้มข้น GA_3 (มก./ล.)	จำนวนใบต่อยอด	ความยาวยอด (ซม.)
0	1.40c	0.20e
0.01	2.71b	0.50d
0.05	3.50a	0.64cd
0.1	3.64a	1.03a
0.5	3.75a	0.85ab
1.0	3.66a	0.81bc
F-test	**	**
C.V.(%)	3.74	11.55

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 9 ผลของ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยืดยาวของยอดส้มโชกุน

ภาพที่ 10 ยอดใหม่ส้มโชกุนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 ความเข้มข้นต่างกัน

5. การศึกษาผลของ NAA และ IBA ต่อการสร้างราก

จากการเพาะเลี้ยงยอดใหม่ในอาหารสูตร MS หรือ MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA เข้มข้น 1, 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ IBA เข้มข้น 0.5, 1, 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ให้การสร้างรากโดยเฉลี่ย 65.89 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้การสร้างราก 50.12 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างรากมากที่สุด 78.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) เมื่อพิจารณาจำนวนรากเฉลี่ย พบว่า อาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ให้จำนวนรากโดยเฉลี่ย 1.90 ราก มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้จำนวนรากเฉลี่ย 1.66 ราก และอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 2.86 ยอด (ตารางที่ 15 ภาพที่ 11) ส่วนความยาวรากนั้น พบว่า อาหารสูตร MS ให้ความยาวรากเฉลี่ย 5.08 เซนติเมตร มากกว่าอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งให้ความยาวเฉลี่ย 4.84 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 8.30 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตร MS เติม IBA เข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 15)

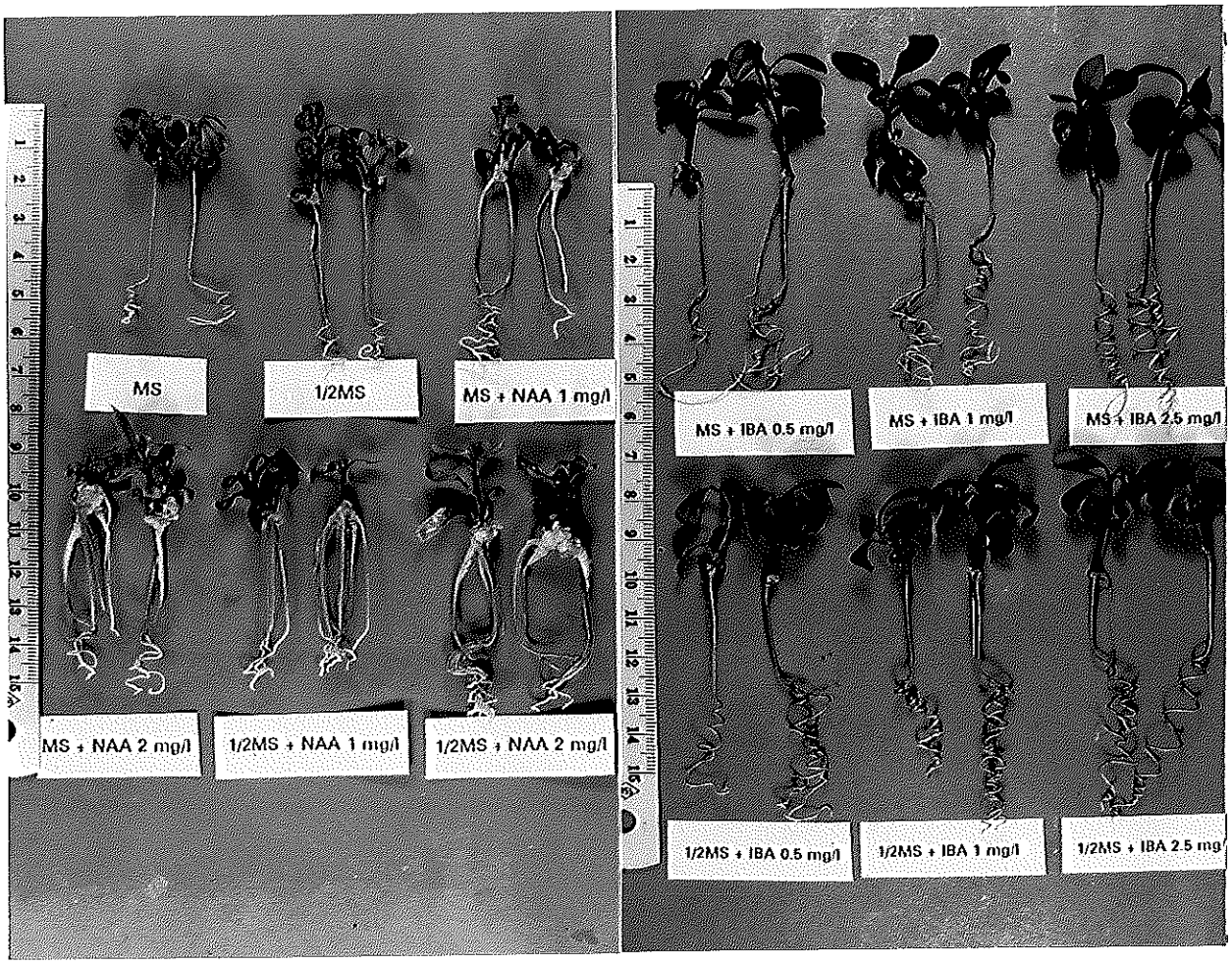
หลังจากย้ายส้มต้นใหม่ที่มีรากจากอาหารชักนำรากสูตรต่างๆ ปลูกลงดินเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ส้มต้นใหม่จากอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง มีชีวิตรอดโดยเฉลี่ย 88.88 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าส้มต้นใหม่จากอาหารสูตร MS ซึ่งมีชีวิตรอด 76.66 เปอร์เซ็นต์ การชักนำรากในอาหารเติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด 93.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15 ภาพที่ 12)

ตารางที่ 15 ผลของ NAA และ IBA ต่อการสร้างรากจากยอดใหม่ส้มโชกุน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน และการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก 1 เดือน

สูตรอาหาร	NAA (มก./ล.)	IBA	การสร้างราก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)	การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
MS	-	-	11.54d	1.00c	3.50e	70b
MS	1	-	51.66b	2.00abc	3.21e	80ab
MS	2	-	48.33b	2.50ab	2.94e	80ab
MS	-	0.5	51.11b	1.40bc	7.80a	70b
MS	-	1	71.42a	1.30bc	7.57ab	80ab
MS	-	2.5	66.66a	1.80abc	5.30cd	80ab
เฉลี่ย			**50.12**	**1.66**	**5.08**	**76.66**
1/2MS	-	-	25.00c	1.16c	3.76de	90a
1/2MS	1	-	78.33a	2.86a	3.11e	93.33a
1/2MS	2	-	70.00a	2.78a	2.21e	90a
1/2MS	-	0.5	71.42a	1.40bc	8.30a	90a
1/2MS	-	1	75.00a	1.75abc	6.10bc	80ab
1/2MS	-	2.5	75.61a	1.50bc	5.60c	90a
เฉลี่ย			**65.89**	**1.90**	**4.84**	**88.88**
F-test			**	**	**	*
C.V. (%)			10.14	26.18	14.18	9.91

* และ ** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



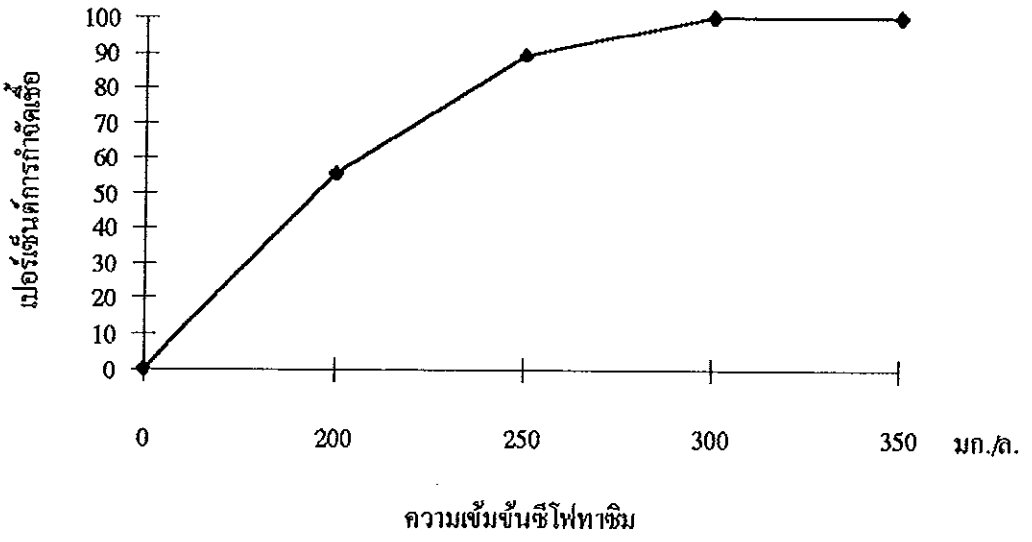
ภาพที่ 11 รากจากยอดส้มโชกุนที่ชักนำในอาหารเติม NAA หรือ IBA ความเข้มข้นต่างกัน

ภาพที่ 12 ส้มต้นใหม่หลังย้ายปลูกลงดิน 1 เดือน

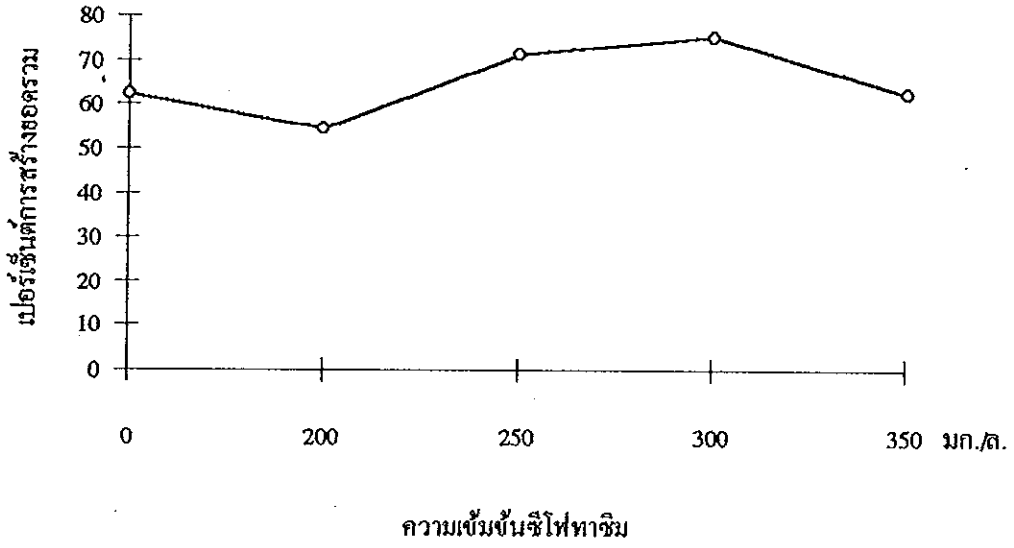
6. การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

6.1 การศึกษาผลของซีโฟทาซิมต่อการกำจัดเชื้อและสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

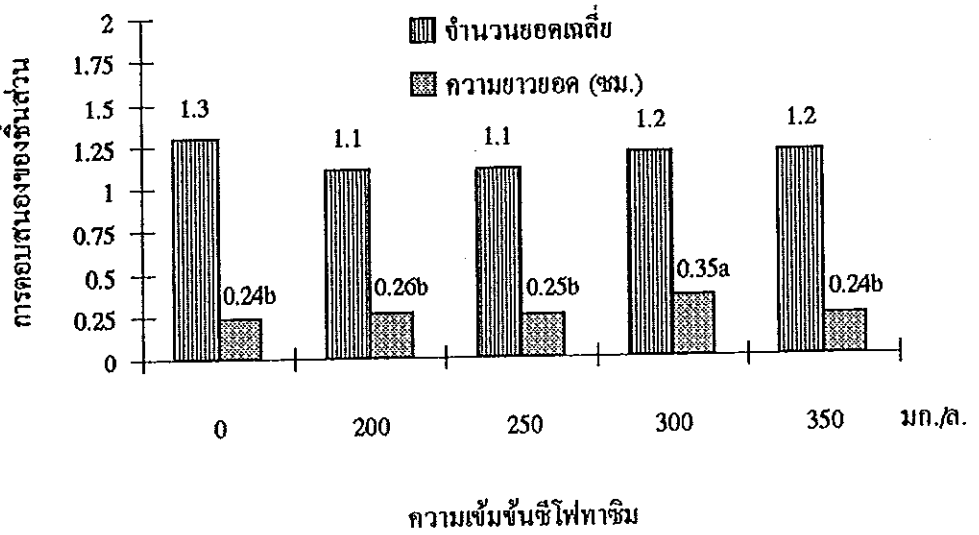
การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนโดยเลี้ยงร่วมกับเชื้อเพื่อศึกษาการกำจัดเชื้อและไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเพื่อศึกษาการสร้างยอดรวม ในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟทาซิมความเข้มข้น 0, 200, 250, 300, 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 และ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับซีโฟทาซิมความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 13) ส่วนการใช้ซีโฟทาซิมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีผลแตกต่างทางสถิติต่อการสร้างยอดรวม ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมสูงที่สุด 75.00 เปอร์เซ็นต์ การใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้มีผลให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมลดลง (ภาพที่ 14) ในกรณีของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน และความยาวยอด พบว่า อาหารปราศจากซีโฟทาซิมให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนมากที่สุด 1.3 ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นอื่นๆ อย่างไรก็ตามซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 และ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนมากกว่าซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความยาวยอด พบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดมากที่สุด 0.35 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับการเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 15 และ 16)



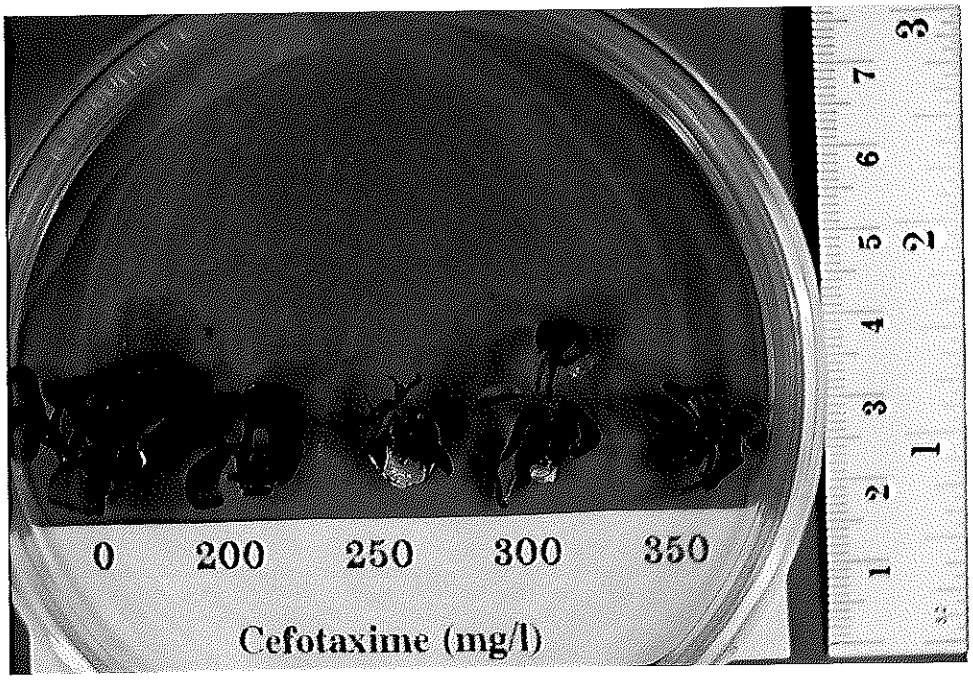
ภาพที่ 13 ผลของซีโฟทาซิมต่อการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มโชกุน



ภาพที่ 14 ผลของซีโฟทาซิมต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน



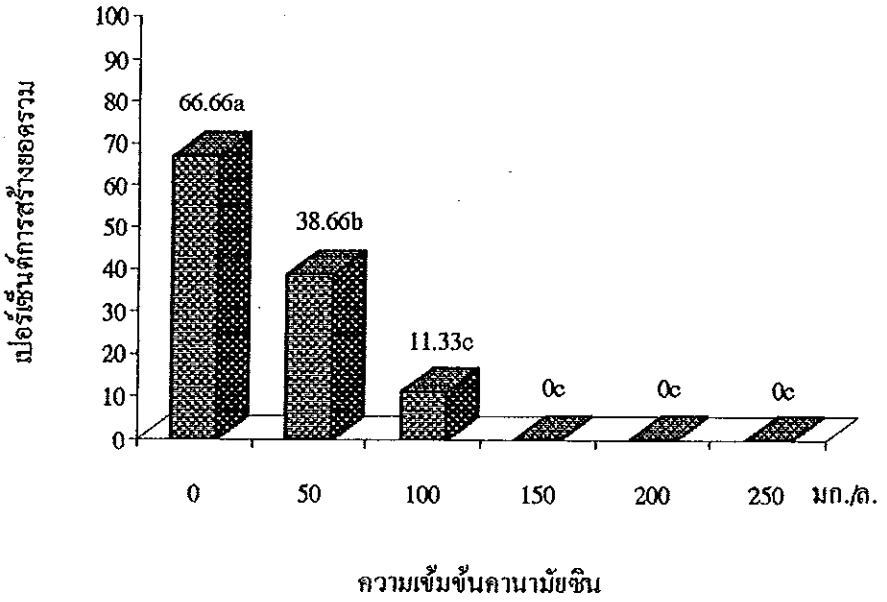
ภาพที่ 15 ผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน ค่าเฉลี่ยความยาวยอดที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 16 ยอดรวมที่ชักนำในอาหารเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่างกัน

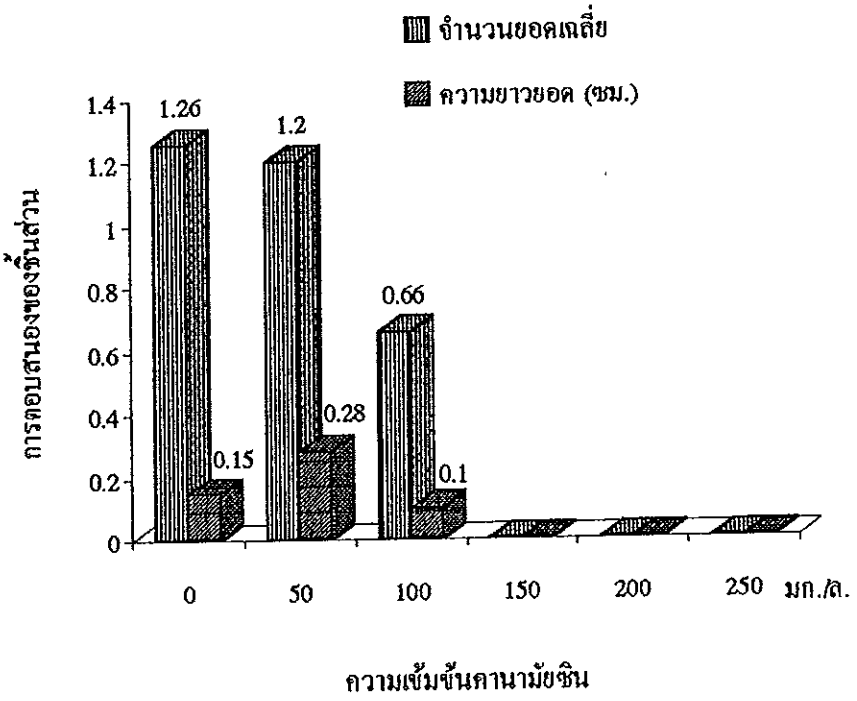
6.2 การศึกษาผลของคานามัยซินต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน ในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซินความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารปราศจากคานามัยซินให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 66.66 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคานามัยซิน 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม 38.66 และ 11.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ส่วนคานามัยซินเข้มข้น 150-250 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการสร้างยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17) ในกรณีของจำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารที่ปราศจากคานามัยซินให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.26 ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติกับคานามัยซิน 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความยาวยอดนั้น พบว่าอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดมากที่สุด 0.28 เซนติเมตร (ภาพที่ 18) และพบว่า ยอดที่ชักนำในอาหารเติมคานามัยซินมีลักษณะผิดปกติ ใบบิดเบี้ยวมีสีซีด (ภาพที่ 19)

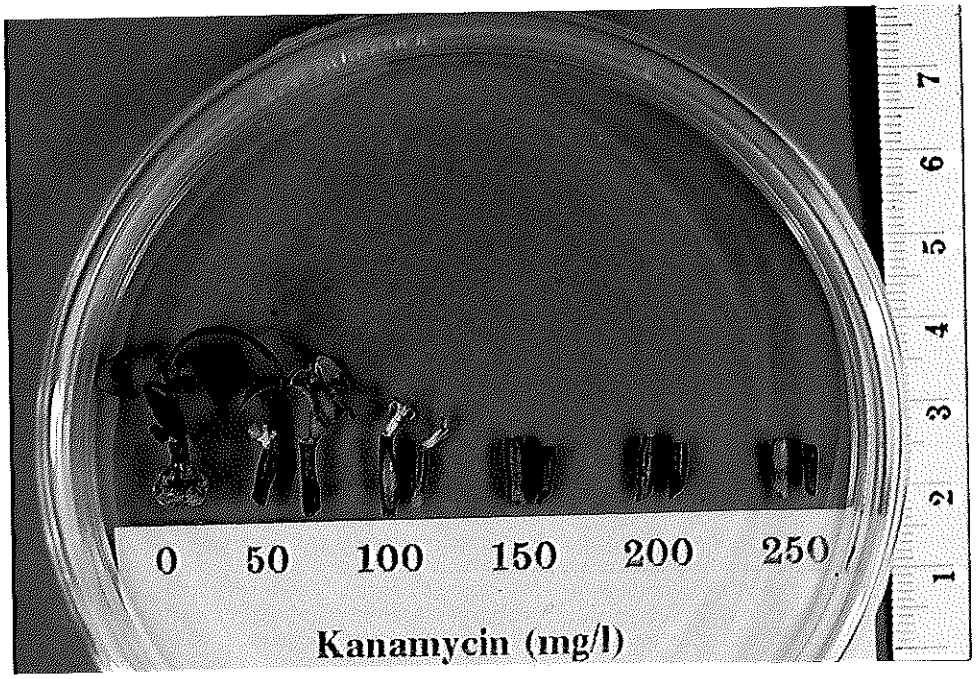


ภาพที่ 17 ผลของคานามัยซินต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน

เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



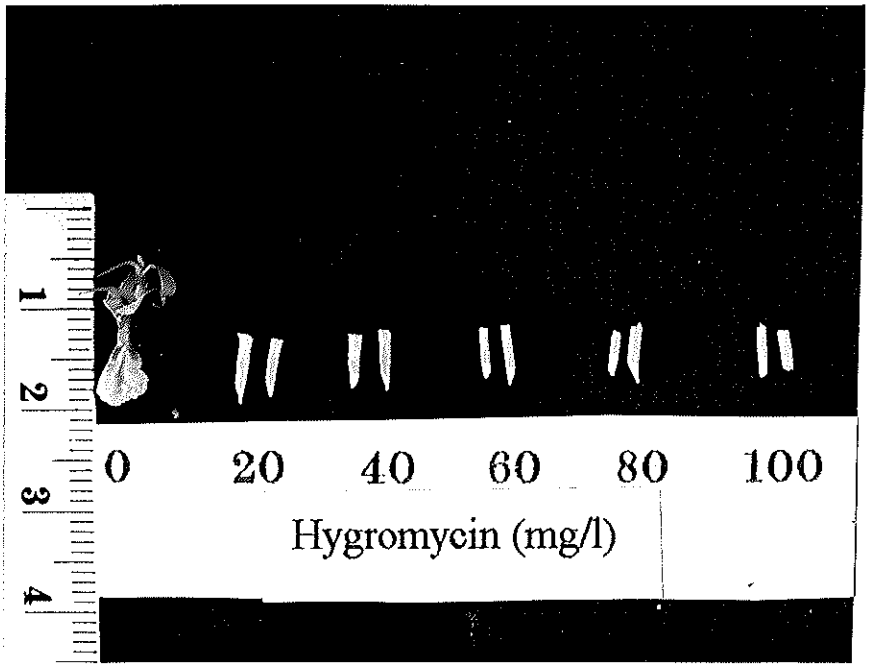
ภาพที่ 18 ผลของคานามัยซินต่อจำนวนและความยาวยอดจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน



ภาพที่ 19 ยอดรวมที่ชักนำในอาหารเติมคานามัยซินความเข้มข้นต่างกัน

6.3 การศึกษาผลของไฮโกรมัยซินต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน บนอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ไม่มีการสร้างยอดเกิดขึ้นในอาหารเติมไฮโกรมัยซินทุกความเข้มข้น ส่วนหน่วยทดลองเปรียบเทียบมีการสร้างยอด 1.40 ยอด (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างกัน

6.4 การศึกษาผลของคานามัยซินและซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุน บนอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซินเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟทาซิมเข้มข้น 200, 250, 300, 350 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า มีการสร้าง ยอดรวมเกิดขึ้นเฉพาะในอาหารเติมซีโฟทาซิมทุกความเข้มข้นร่วมกับคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามจำนวนและเปอร์เซ็นต์ยอดที่สร้างน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบซึ่งปราศจากคานามัยซิน การเติมซีโฟทาซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 50.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับการใช้ซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซินความเข้มข้นเดียวกัน คือ 0.66 ยอด (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลของคานามัยซินและซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อจำนวนยอดเฉลี่ยจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงของต้นกล้าส้มโชกุนอายุ 1 เดือน ที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MTร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

ซีโฟทาซิม	คานามัยซิน (มก./ล.)					
(มก./ล.)	0	50	100	150	200	250
0	1.91 (65.00)	1.2 (40.00)	1 (11.33)	-	-	-
200	2 (50.00)	0.50 (33.33)	-	-	-	-
250	1.5 (50.00)	0.66 (33.33)	-	-	-	-
300	1.7 (66.66)	0.66 (50.00)	-	-	-	-
350	1 (50.00)	0.5 (33.33)	-	-	-	-

ตัวเลขในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม

7. การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

7.1 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยการคัดเลือกด้วยคานามัยซิน

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนบนอาหารสูตร MT หยดเชื้อ อะโกรแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดเติมคานามัยซินและซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า มีการสร้างยอดรวมเกิดขึ้นบนอาหารเติมซีโฟทาซิมทุกความเข้มข้นร่วมกับ คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้น เปอร์เซ็นต์และจำนวนยอด ที่สร้างน้อยกว่าชุดเปรียบเทียบที่ไม่เติมคานามัยซิน การเติมซีโฟทาซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวมมากที่สุด 0.66 ยอด อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดไม่แตกต่างกับการเติมซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับคานามัยซินความเข้มข้นเดียวกัน คือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17) สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออก

ตารางที่ 17 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนที่เลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA4404 ในอาหารเติมคานามัยซินความเข้มข้นต่างๆ ตรวจผลหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ซีโฟทาซิม	คานามัยซิน (มก./ล.)					
(มก./ล.)	0	50	100	150	200	250
0	1.0 (40.00)	0.70 (33.33)	-	-	-	-
200	1.7 (33.33)	0.50 (16.66)	-	-	-	-
250	1.5 (66.66)	0.50 (33.33)	-	-	-	-
300	1.5 (66.66)	0.66 (33.33)	-	-	-	-
350	1 (33.33)	0.50 (16.66)	-	-	-	-

ตัวเลขในวงเล็บแสดงเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม

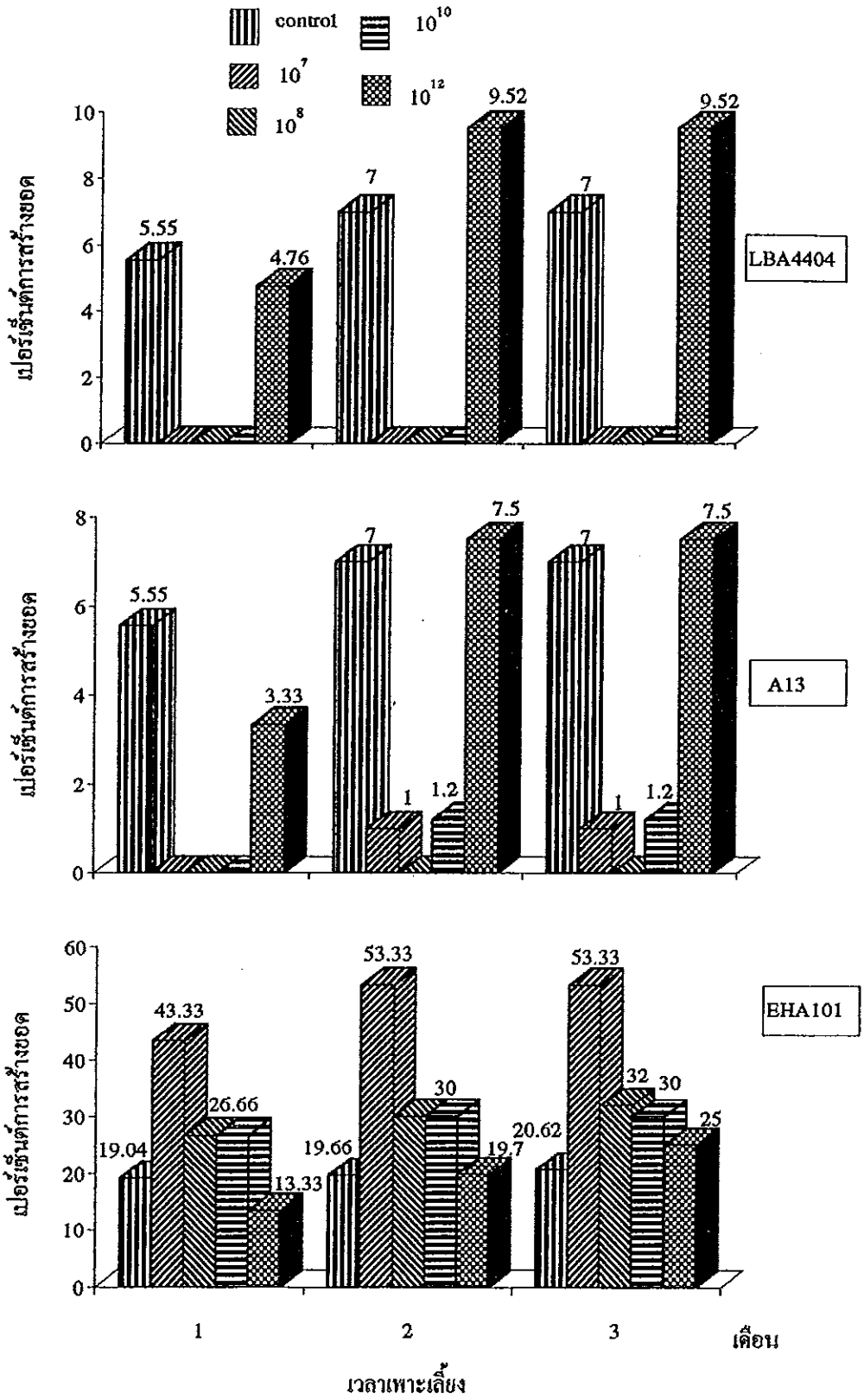
7.2 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยการคัดเลือกด้วยไฮโกรมัยซิน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนบนอาหารสูตร MT ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok233 แล้วย้ายไปเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำยอดเติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ไม่มีการสร้างยอดรวมเกิดขึ้นในอาหารเติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไฮโกรมัยซินทุกความเข้มข้น ส่วนหน่วยทดลองเปรียบเทียบมีการสร้างยอดรวม 1.20 ยอด สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออก

8 การศึกษาผลของความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีน

จากการเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายเชื้อ ที่มีความหนาแน่น 1.2×10^{7}, 1.2×10^{8}, 1.2×10^{10} และ 1.2×10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สายเชื้อ EHA101 ความหนาแน่น 1.2×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับความหนาแน่นอื่นๆ รวมทั้งสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ซึ่งให้การสร้างยอดรวมเฉพาะความหนาแน่นเชื้อ 1.2×10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 21) ในทำนองเดียวกับการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 ซึ่งสายเชื้อ EHA101 ความหนาแน่น 1.2×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 53.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับความหนาแน่นอื่นๆ รวมทั้งสายเชื้อ LBA4404 และ A13 เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเดือนที่ 1 พบว่า สายเชื้อ EHA101 ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยมากที่สุด 1.09 ยอด ใกล้เคียงกับชุดเปรียบเทียบซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.45 ยอด แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับความหนาแน่นอื่นๆ และการเพิ่มความหนาแน่นเชื้อทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง ส่วนสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ที่ความหนาแน่น 1.2×10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดเปรียบเทียบ (ตารางที่ 18 ภาพที่ 22) ในทำนองเดียวกับการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 พบว่า สายเชื้อ EHA101 ให้จำนวนยอดโดยเฉลี่ยมากที่สุด 1.50 และ 1.58 ยอด โดยความหนาแน่นเชื้อ 1.2×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดทั้งการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 คือ 1.66 และ 1.70 ยอด ในกรณีความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า สายเชื้อ EHA101 ให้ความยาวยอดโดยเฉลี่ยมากที่สุด 0.13 เซนติเมตร โดยความหนาแน่นเชื้อ 1.2×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 0.21 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) กับความหนาแน่นอื่นๆ รวมทั้งสายเชื้อ LBA4404 และ A13 (ตารางที่ 18) เช่นเดียวกับการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากัน 0.29 เซนติเมตร และจากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออกในยอดใหม่และลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อ หลังจากย้ายเลี้ยงต่อไป พบว่า ยอดใหม่จากการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับสายเชื้อ A13 ทุกความหนาแน่น และสายเชื้อ LBA4404 ทุกความหนาแน่นยกเว้นความหนาแน่น 1.2×10^{12} เซลล์

ต่อมิลลิลิตร มีการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยอดใหม่จากการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับสายเชื้อ EHA101 ความหนาแน่น 1.2 x 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการตายมากที่สุด 87.50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 23)



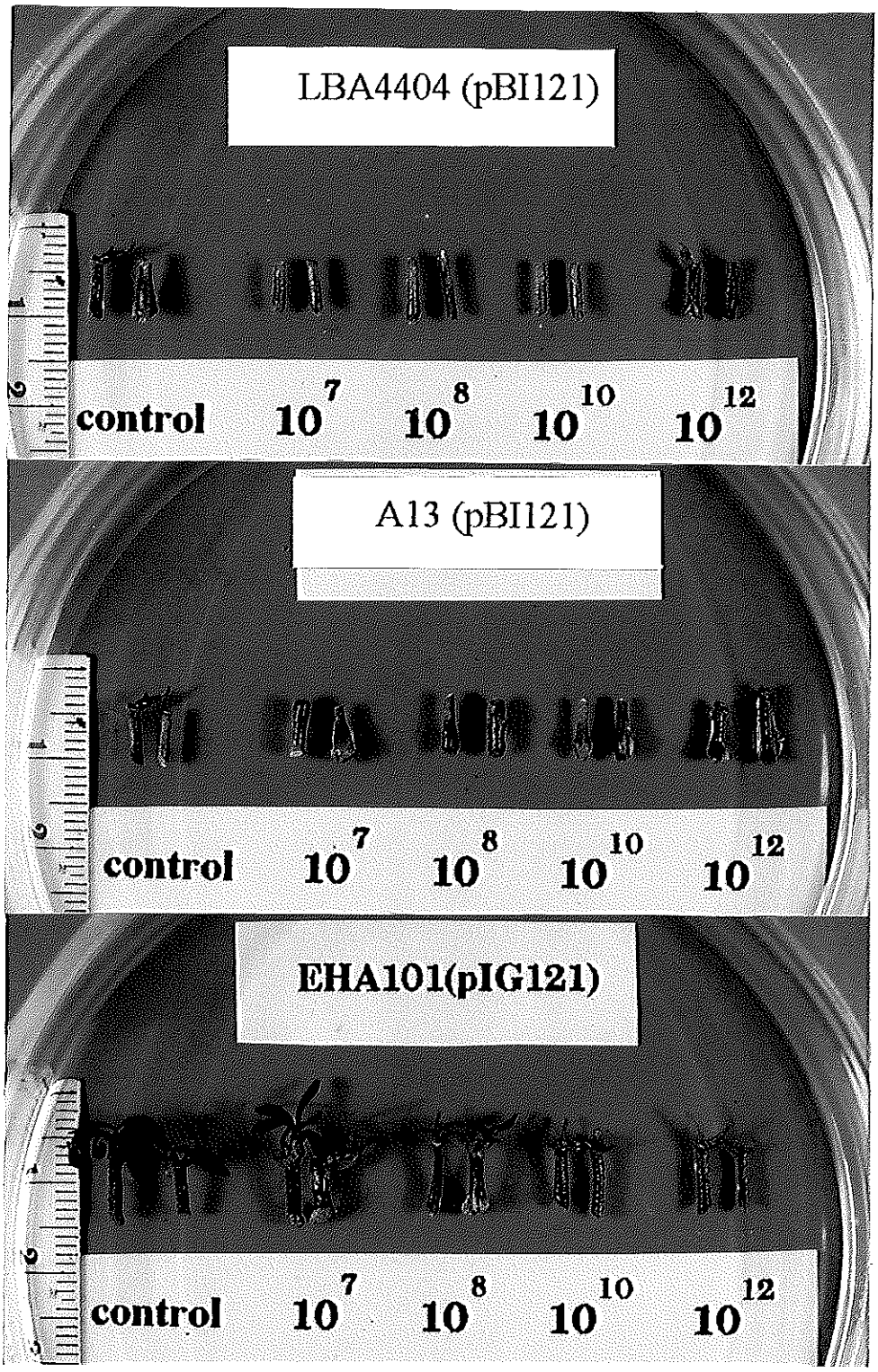
ภาพที่ 21 เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน

ตารางที่ 18 ผลของความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง หลังวางเลี้ยงในอาหารเติม คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟทาซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

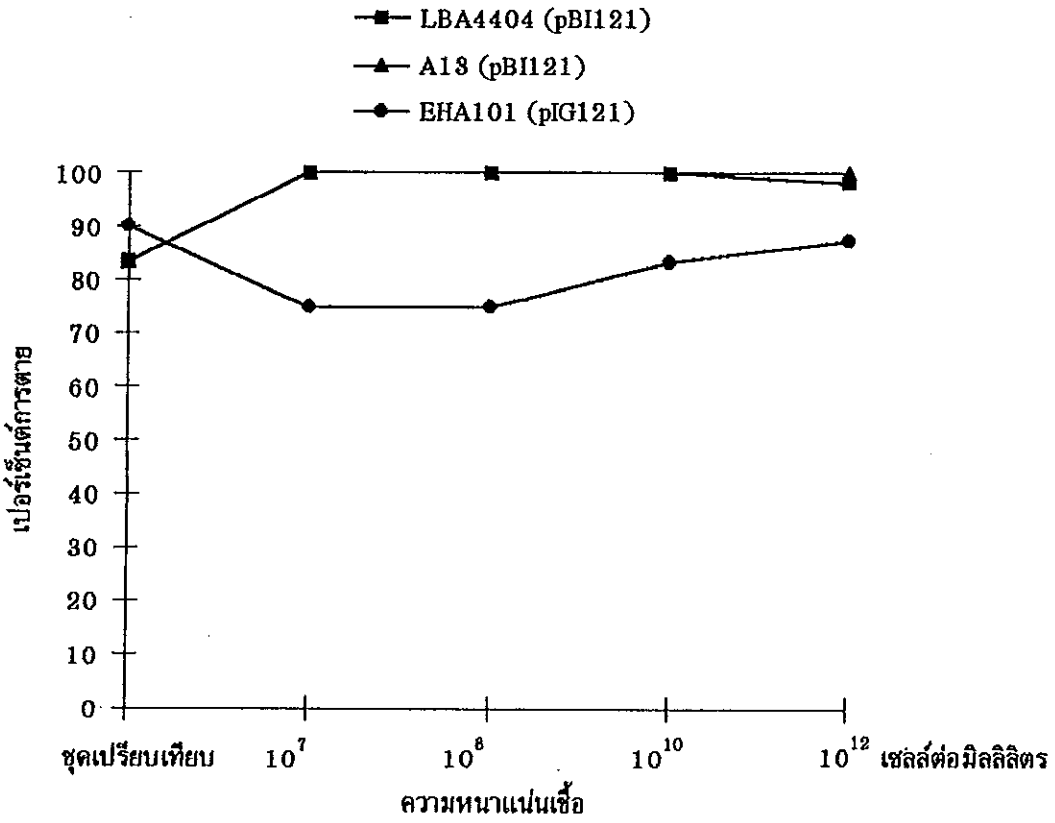
เชื้ออะโกรแบคทีเรีย	ความหนาแน่นเชื้อเซลล์ต่อมิลลิลิตร	จำนวนยอดเฉลี่ย เดือนที่			ความยาวยอด (ซม.) เดือนที่		
		1	2	3	1	2	3
control (YEB)	0	1.10bc	1.20b	1.35bc	0.11bc	0.12ab	0.13b
LBA4404	10^7	0.00e	0.00d	0.00e	0.00d	0.00b	0.00c
(pBI121)	10^8	0.00e	0.00d	0.00e	0.00d	0.00b	0.00c
	10^{10}	0.00e	0.00d	0.00e	0.00d	0.00b	0.00c
	10^{12}	1.10bc	1.50ab	1.60ab	0.10bc	0.15ab	0.15b
เฉลี่ย		**0.44**	**0.54**	**0.59**	**0.04**	**0.05**	**0.05**
control (YEB)	0	1.10bc	1.20b	1.35bc	0.11bc	0.12ab	0.13b
A13	10^7	0.00e	0.30cd	0.60d	0.00d	0.05ab	0.07bc
(pBI121)	10^8	0.00e	0.00d	0.00e	0.00d	0.00b	0.00c
	10^{10}	0.00e	0.50c	0.50d	0.00d	0.09ab	0.10bc
	10^{12}	1.00c	1.20b	1.20c	0.10bc	0.12ab	0.15b
เฉลี่ย		**0.42**	**0.64**	**0.73**	**0.04**	**0.07**	**0.09**
control(LB)	0	1.45a	1.56ab	1.60ab	0.11bc	0.16ab	0.16b
EHA101	10^7	1.23b	1.54ab	1.60ab	0.21a	0.29a	0.29a
(pIG121)	10^8	1.13bc	1.66a	1.70a	0.13b	0.20ab	0.20ab
	10^{10}	1.00c	1.37ab	1.50ab	0.11bc	0.18ab	0.20ab
	10^{12}	0.66d	1.37ab	1.50ab	0.09c	0.15ab	0.15b
เฉลี่ย		**1.09**	**1.50**	**1.58**	**0.13**	**0.19**	**0.2**
F-test		**	**	**	**	**	**
C.V.(%)		10.41	13.72	9.22	17.91	26.70	33.11

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



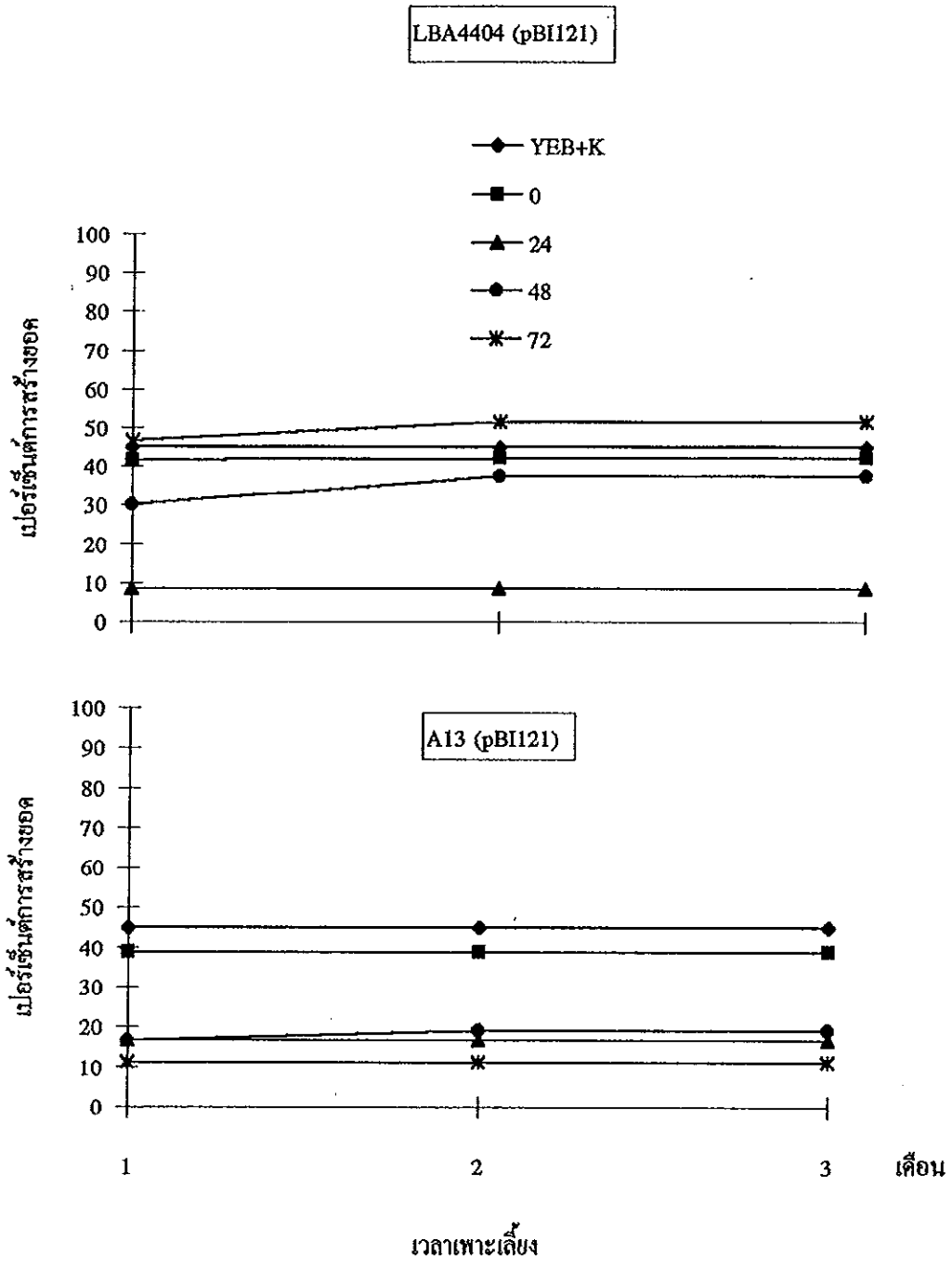
ภาพที่ 22 ยอดรวมที่สร้างจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงซึ่งเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน



ภาพที่ 23 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดใหม่จากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน

9. การศึกษาผลของเวลาในการอินคิวเบทเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือในเลี้ยงต้นกล้าส้มโชกุนบนอาหารสูตร MT ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อที่อินคิวเบทเป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอดเติมซีโฟทาซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกยอดรวมหลังจากปลูกถ่ายยีนในแต่ละสายเชื้อ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ที่อินคิวเบทเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้การสร้างยอดรวมสูงที่สุด 46.66 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าหน่วยทดลองเปรียบเทียบที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ให้การสร้างยอดรวม 45.00 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติกับเวลาอินคิวเบทเชื้อ 48 ชั่วโมง และชุดเปรียบเทียบ (ภาพที่ 24) เช่นเดียวกับการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 และอินคิวเบทเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้การสร้างยอดรวมสูงที่สุดเท่ากัน 51.51 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.01$) สายเชื้อ A13 และเวลาอินคิวเบทอื่นๆ ในกรณีของการเกิดยอดใหม่ พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ให้ผลดีกว่าชุดเปรียบเทียบ ที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยการอินคิวเบทเชื้อเวลา 72 ชั่วโมง ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 0.86 ยอด (ตารางที่ 19 ภาพที่ 25) เช่นเดียวกับการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากัน 1.04 เซนติเมตร ส่วนความยาวยอด พบว่า ชุดเปรียบเทียบ และสายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ที่เวลาอินคิวเบทเชื้อ 0 ชั่วโมง ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 0.13 เซนติเมตร (ตารางที่ 19) และเมื่อย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ 3 พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ที่อินคิวเบทเวลา 48 ชั่วโมง ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากัน 0.30 และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ และการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออกในยอดใหม่ และลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ทั้ง 2 สายเชื้อ อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายเลี้ยงต่อไป พบว่า มีการตายของยอดใหม่ โดยสายเชื้อ A13 ที่เวลาอินคิวเบทเชื้อ 48 และ 72 ชั่วโมง รวมทั้งชุดเปรียบเทียบ ส่งผลให้ยอดใหม่ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 26) และยอดใหม่ส่วนที่เหลือตายหมดเมื่อย้ายเลี้ยงต่อไป



ภาพที่ 24 เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทเชื้อในเวลาต่างกัน

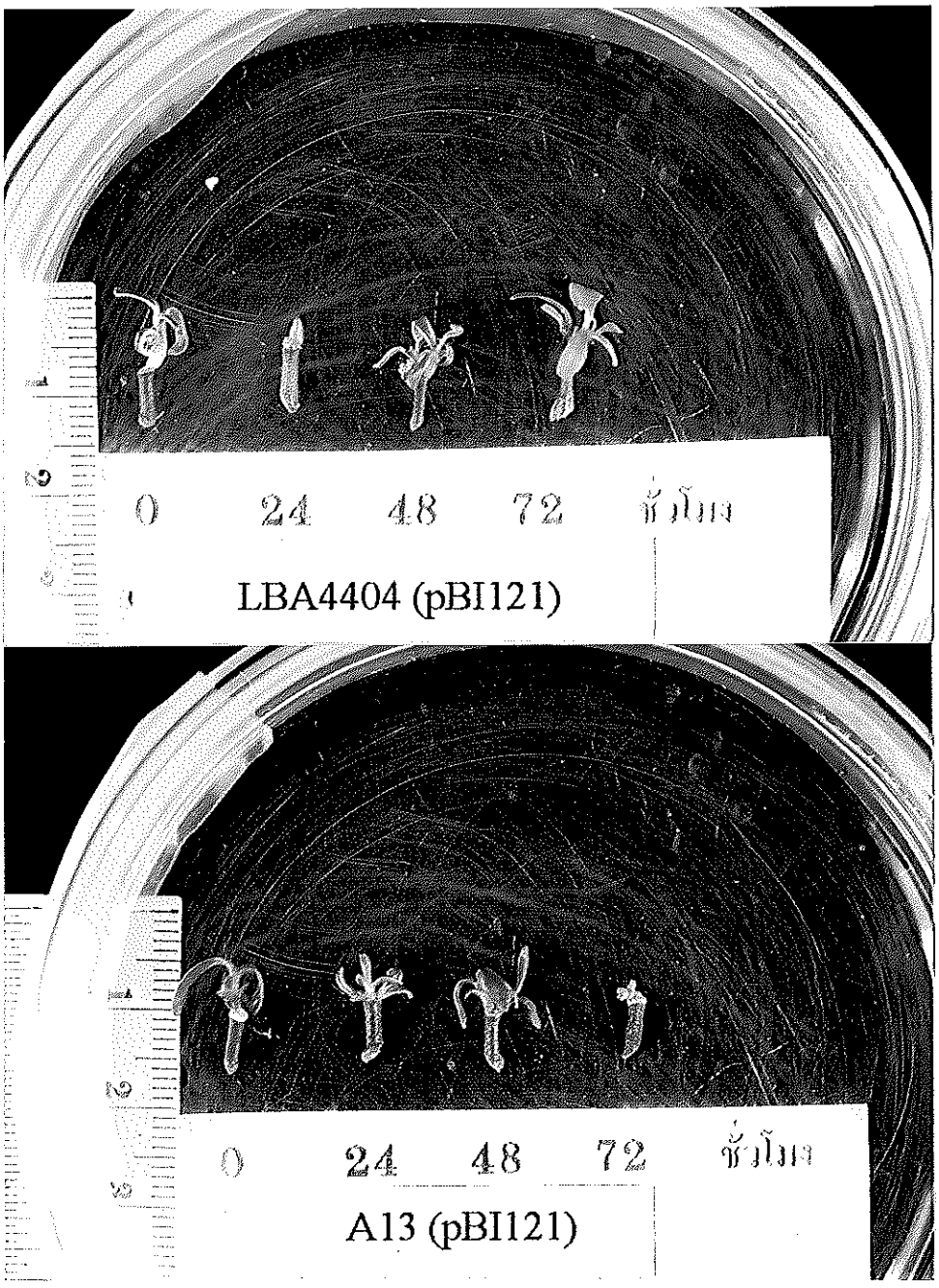
ตารางที่ 19 จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยของยอดใหม่จากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทเวลาแตกต่างกัน

เชื้ออะโกรแบคทีเรีย	เวลาอินคิวเบท (ชั่วโมง)	จำนวนยอดเฉลี่ย เดือนที่			ความยาวยอด (ซม.) เดือนที่		
		1	2	3	1	2	3
control+Km	-	0.55abc	0.61c	0.61c	0.13a	0.20b	0.22bc
A. tumefaciens	0	0.50abc	0.60c	0.60c	0.13a	0.17c	0.25b
LBA4404	24	0.21c	0.40d	0.40d	0.01d	0.05e	0.07e
(pBI121)	48	0.63abc	0.75b	0.75b	0.12a	0.30a	0.35a
	72	0.86a	1.04a	1.04a	0.06abcd	0.19bc	0.20c
	เฉลี่ย	**0.55**	**0.68**	**0.68**	**0.09**	**0.18**	**0.25**
control + Km	-	0.55abc	0.61c	0.61c	0.13a	0.20b	0.22bc
A. rhizogenes	0	0.66ab	0.75b	0.75b	0.10abc	0.20b	0.25b
A13(pBI121)	24	0.27bc	0.30d	0.30d	0.05bcd	0.10d	0.14d
	48	0.50abc	0.57c	0.57c	0.07abcd	0.10d	0.12d
	72	0.33bc	0.40d	0.40d	0.04cd	0.07e	0.10de
	เฉลี่ย	**0.46**	**0.52**	**0.52**	**0.07**	**0.13**	**0.20**
		*	**	**	*	*	**
		44.05	5.70	5.70	49.53	4.47	6.98

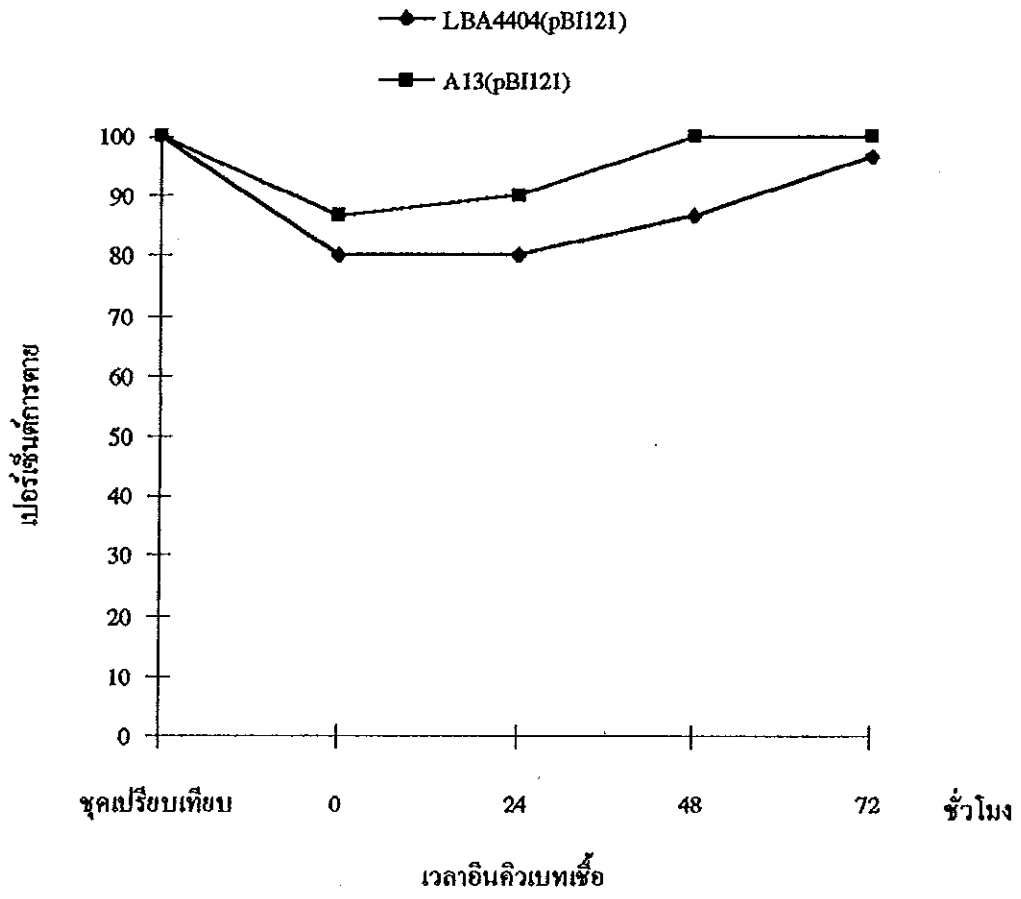
Km: Kanamycin

* และ ** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ และ 0.01

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT



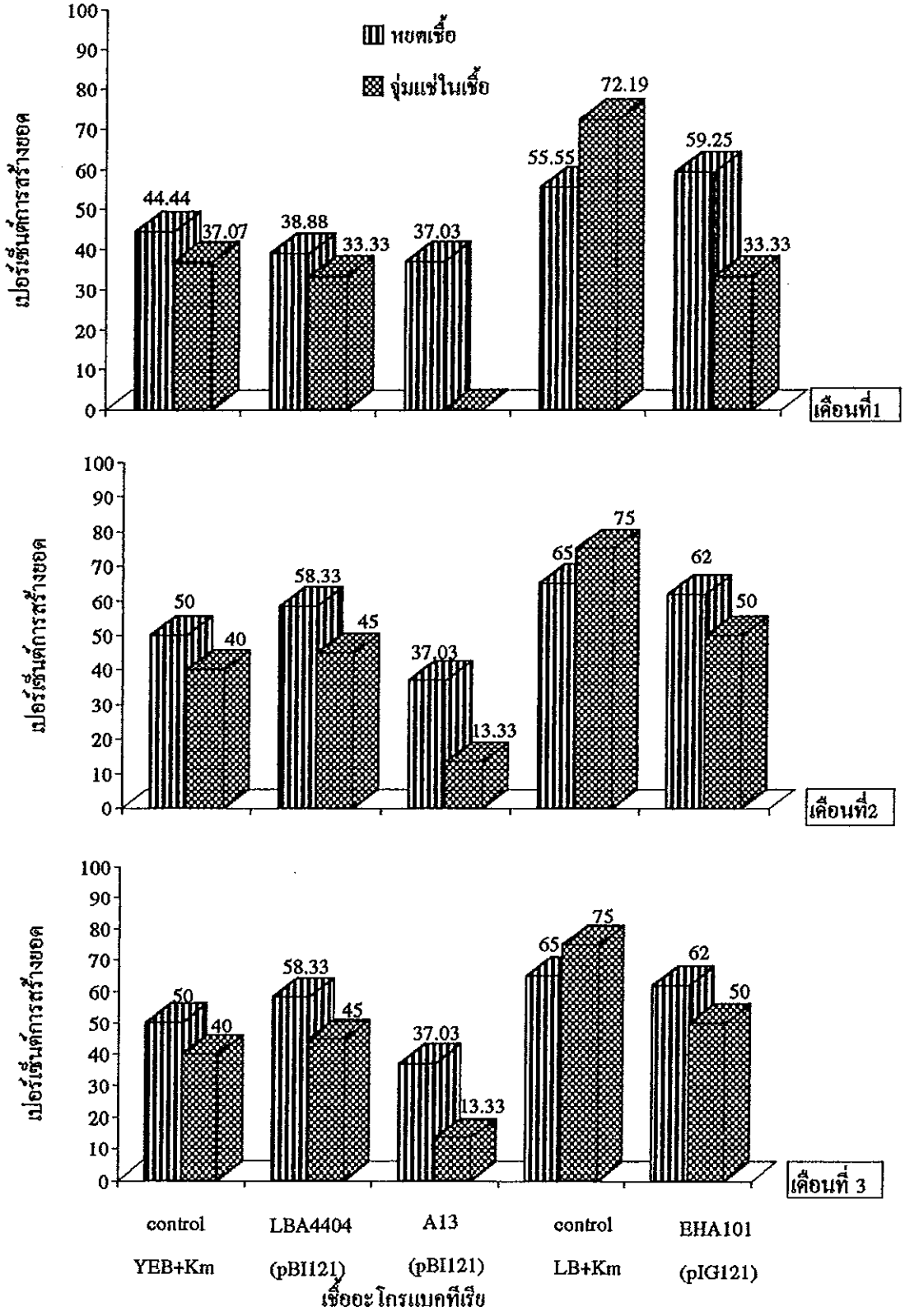
ภาพที่ 25 ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทในเวลาต่างกัน



ภาพที่ 26 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดใหม่จากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่อินคิวเบทเชื้อในเวลาต่างกัน

10. การศึกษาผลของวิธีการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีน

จากการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยวิธีการจุ่มแช่และหยดเชื้อ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารกำจัดเชื้อ และคัดเลือก เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า วิธีการเลี้ยงร่วมโดยการหยดเชื้อให้การสร้างยอดโดยเฉลี่ย มากกว่าการเลี้ยงร่วมโดยวิธีการจุ่มแช่ อย่างไรก็ตามชุดเปรียบเทียบที่จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตร LB ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 72.19 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติกับสายเชื้อ EHA101 และชุดเปรียบเทียบที่หยดด้วยอาหารเหลวสูตร LB ซึ่งให้การสร้างยอด 59.25 และ 55.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ให้การสร้างยอดรวมได้ดีกว่าสายเชื้อ A13 ทั้ง 2 วิธีการเลี้ยงร่วม และการจุ่มแช่ชิ้นส่วนในสายเชื้อ A13 ไม่มีการสร้างยอดรวม ในเดือนแรกของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 27) เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ย พบว่า ชุดเปรียบเทียบที่หยดด้วยอาหารเหลวสูตร YEB ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.97 ยอด รองลงมาคือสายเชื้อ EHA101 ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.87 ยอด ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าสายเชื้อ A13 ทั้ง 2 วิธีการเลี้ยงร่วม เป็นในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงเดือนที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 20 ภาพที่ 28) ในกรณีความยาวยอดเฉลี่ย ชุดเปรียบเทียบที่หยดด้วยอาหารเหลวสูตร LB ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 0.23 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดเปรียบเทียบที่จุ่มแช่ด้วยอาหารเหลวสูตร LB และการหยดด้วยสายเชื้อ A13 ให้ความยาวยอดมากกว่าสายเชื้อ LBA4404 ตรงข้ามกับการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนโดยการจุ่มแช่ พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ให้ความยาวยอดมากกว่าสายเชื้อ A13 เป็นในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงเดือนที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 20) และจากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออกในยอดใหม่และลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อ หลังจากย้ายเลี้ยงต่อไป พบว่า ยอดใหม่ที่สร้างจากการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับชุดเปรียบเทียบอาหารสูตร LB เติมคานามัยซิน และสายเชื้อ A13 ทั้ง 2 วิธี รวมทั้งจากการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนกับ 3 สายเชื้อโดยวิธีการจุ่มแช่ มีการตายของยอดใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29) และยอดใหม่ทั้งหมดมีการตายเมื่อย้ายเลี้ยงต่อไป



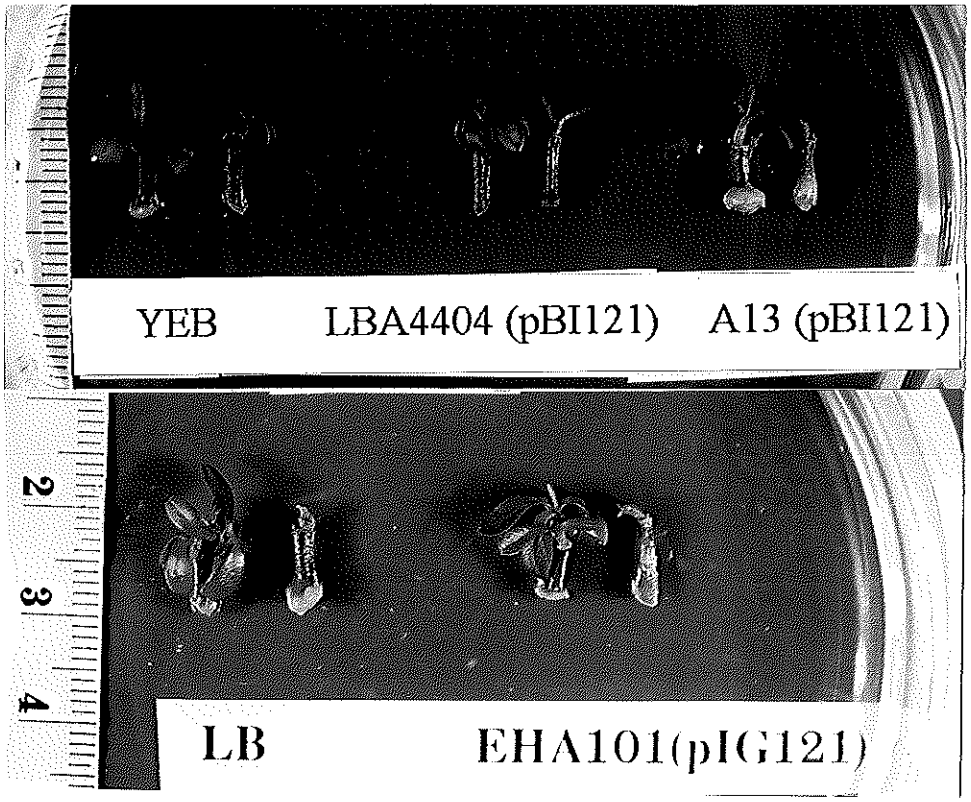
ภาพที่ 27 เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและวิธีการที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 20 ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่อการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นเหนือใบเลี้ยง

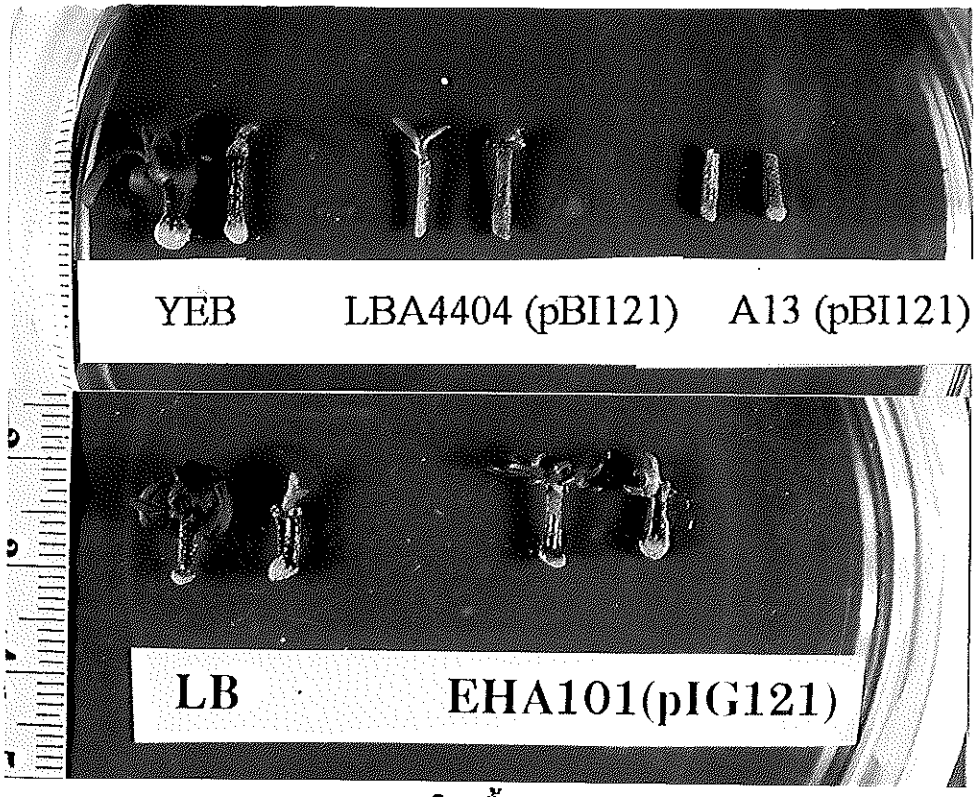
เชื้ออะโกรแบทีเรีย	วิธีการเลี้ยงร่วม	จำนวนยอดเฉลี่ย เดือนที่			ความยาวยอด (ซม.) เดือนที่		
		1	2	3	1	2	3
control (YEB)	หยด	1.97a	2.00a	2.00a	0.18a	0.21ab	0.24a
LBA4404(pBI121)	หยด	1.47b	1.75b	1.75b	0.10b	0.16bc	0.16b
A13(pBI121)	หยด	1.33c	1.63c	1.63c	0.15a	0.17bc	0.18b
เฉลี่ย		**1.59**	**1.79**	**1.79**	**0.14**	**0.18**	**0.19**
control (YEB)	จุ่มแช่	1.47b	1.70b	1.70b	0.19a	0.25a	0.26a
LBA4404(pBI121)	จุ่มแช่	0.97d	1.75b	1.75b	0.09b	0.15c	0.25a
A13(pBI121)	จุ่มแช่	0.00e	0.50d	0.50d	0.00c	0.05d	0.08c
เฉลี่ย		**0.81**	**1.31**	**1.31**	**0.09**	**0.15**	**0.19**
F-test		**	**	**	**	**	**
C.V. (%)		1.08	0.91	0.91	10.91	8.57	7.25
control (LB)	หยด	1.37c	1.72c	1.72c	0.23a	0.26a	0.27a
EHA101(pIG121)	หยด	1.87a	2.00b	2.00b	0.16bc	0.24a	0.26a
เฉลี่ย		**1.62**	**1.86**	**1.86**	**0.19**	**0.25**	**0.26**
control (LB)	จุ่มแช่	1.22d	1.25d	1.25d	0.22ab	0.26a	0.26a
EHA101(pIG121)	จุ่มแช่	1.72b	2.12a	2.12a	0.11c	0.18b	0.18b
เฉลี่ย		**1.47**	**1.68**	**1.68**	**0.16**	**0.22**	**0.22**
F-test		**	**	**	**	**	**
C.V.(%)		0.92	0.80	0.80	7.86	6.02	5.83

** : แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.01$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

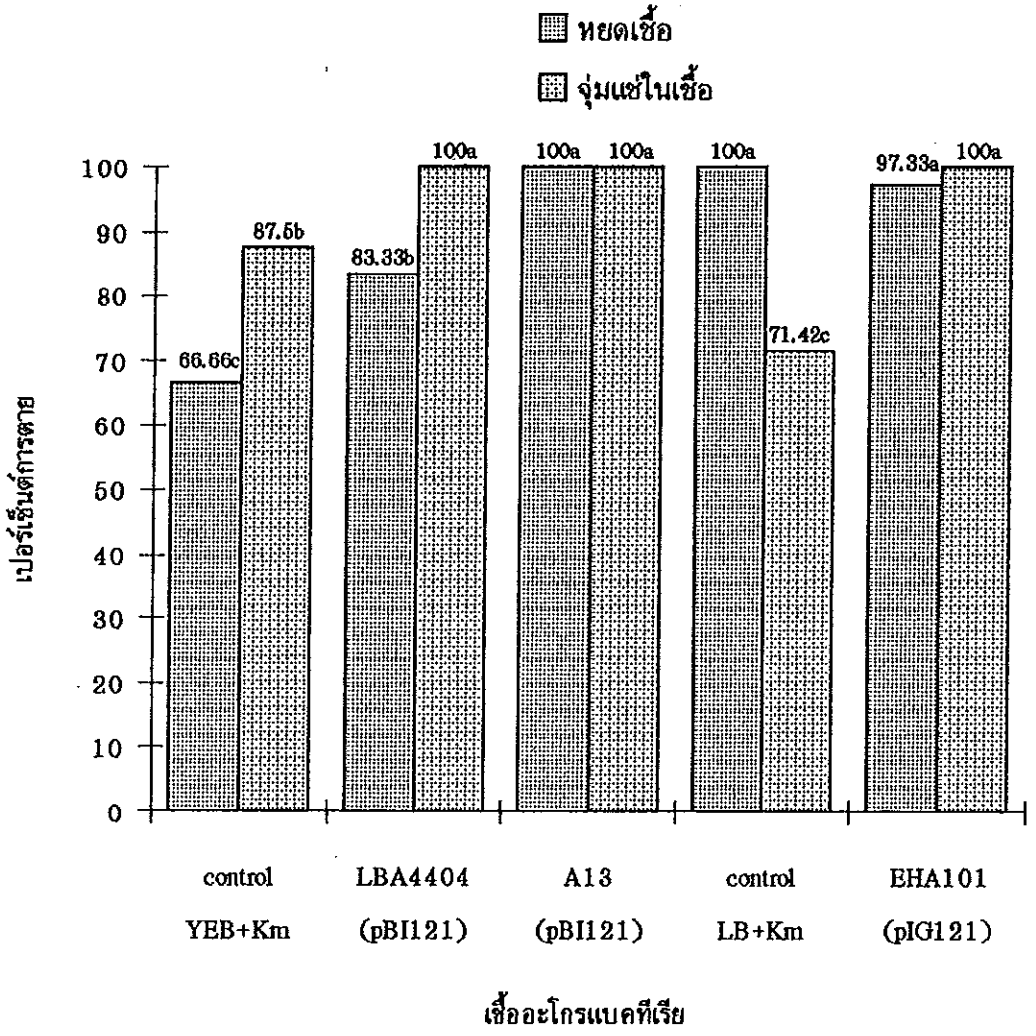


หยดเชื้อ



จุ่มแช่ในเชื้อ

ภาพที่ 28 ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและวิธีการที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 29 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อและวิธีการเลี้ยงร่วมที่แตกต่างกัน

เปอร์เซ็นต์การตายของยอดที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT

บทที่ 4

วิจารณ์

1 การศึกษาผลของ BA ต่อการพัฒนาการของเมล็ดส้มโชกุน

อาหารปราศจาก BA ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารเติม BA ทุกความเข้มข้น เพราะว่าในเมล็ดมีการสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระยะพัฒนาการของผล การเติม BA ในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้มีผลไปยับยั้งการพัฒนาของต้นอ่อน ทำนองเดียวกับจำนวนยอดเฉลี่ยต่อเมล็ด อาหารปราศจาก BA ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่า อาหารเติม BA และการเพิ่มความเข้มข้นของ BA สูงขึ้น ทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลงตามลำดับและให้ยอดที่มีช้อสั้นอ้วนแคระแกร็น ต่างจากการเพาะเลี้ยงลองกองซึ่งพบว่า อาหารเติม BA ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าอาหารปราศจาก BA โดย BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.7 ยอด การเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่านี้ ทำให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลง ส่วนความยาวยอดเฉลี่ย อาหารปราศจาก BA ให้ความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.37 เซนติเมตร และการเติม BA ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้ความยาวยอดลดลงตามลำดับ (วันทนา นวรังสรรค์, 2538) สธน เสนาสวัสดิ์ (2534) เพาะเลี้ยงเมล็ดลองกองในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม BA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพียง 1.1 ยอด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น BA เป็น 20 ไมโครโมลาร์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.5 ยอด ในกรณีความยาวรากอาหารปราศจาก BA ให้ความยาวรากมากที่สุด 5.5 เซนติเมตร การเติม BA ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้ความยาวรากเฉลี่ยลดลงตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเมล็ดส้มโอในอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.44 ยอด (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2531) แม้ว่าในการชักนำยอดรวมจากเมล็ดในพืชอื่นๆ ต้องการ BA เพื่อส่งเสริมการสร้างยอดรวม แต่ในการศึกษานี้ BA ไม่มีผลดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเมล็ด เพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป นอกจากนี้การใช้ชิ้นส่วนต่างๆ จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในอาหารดังกล่าวมีการเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยให้การแปรผลมีความถูกต้องแม่นยำไม่มีอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญในอาหารเริ่มต้นมาเกี่ยวข้อง เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มต่างๆ จากชิ้นส่วนต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง (Edriss and Burger, 1984; Sim *et al.*, 1989; Goh *et al.*, 1995)

2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มชนิดต่างๆ พบว่า ส่วนใหญ่ส้มมีการตอบสนองต่อไซโตไคนินได้ดีโดยเฉพาะ BA (Kitto and Young,1981;Bhat *et al.*, 1992;Goh *et al.*, 1995) ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุนนี้พบว่า BA ให้การสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ KN และ 2-iP เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงปลายยอดส้ม Carrizo citrange และ Cleopatra mandarin (Kitto and Young, 1981) อย่างไรก็ตามความเข้มข้น BA ที่เหมาะสมขึ้นกับพันธุ์ที่ศึกษา ในการทดลองนี้ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวม 75 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ย 1.65 ยอด (ตารางที่ 2) เป็นไปในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงข้อและรากของต้นกล้ามะนาว (Bhat *et al.*, 1992) และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโอ (Goh *et al.*, 1995) และส้มจี๊ด (Sim *et al.*, 1989)

มีรายงานจำนวนมากในไม้ผลและไม้ยืนต้นใช้ TDZ เพื่อชักนำยอดรวม (Huetteman and Preece, 1993) ในการศึกษานี้ได้ทดลองเปรียบเทียบผลของ BA กับ TDZ ด้วย จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุน ในอาหารเติม BA ให้การสร้างยอดรวมได้ดีกว่า TDZ โดย BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดทั้ง 3 ชิ้นส่วน ชิ้นส่วนโดยปลายยอดมีการสร้างยอดรวมได้มากที่สุด 2.33 ยอด (ตารางที่ 4) ในทำนองเดียวกับการทดลองของ Kim และคณะ (1997) ซึ่งรายงานว่า BA ให้การสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงตายอดต้น Green ash (*Fraxinus pennsylvania* Marsh.) สายพันธุ์ SD2002 ได้ดีกว่า TDZอย่างไรก็ตามในการศึกษาดังกล่าวใช้ BA ความเข้มข้นสูงถึง 80 ไมโครโมลาร์ การใช้ BA ความเข้มข้นสูงในการทดลองนี้ทำให้ใบส้มเป็นใบแก้วเพิ่มมากขึ้น ส่วนการเติม TDZ ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดแคลลัสตรงฐานยอดและยอดมีขนาดเล็ก ใบเล็กและร่วงเมื่อย้ายเลี้ยง เนื่องจากความเข้มข้น TDZ สูงเกินไป ทำให้ส่งเสริมการสร้างแคลลัส Preece และคณะ (1991) รายงานว่า TDZ ความเข้มข้นสูงกว่า 1 ไมโครโมลาร์ (0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระตุ้นการสร้างแคลลัสและยับยั้งการเจริญของตาข้าง ในการเพาะเลี้ยงข้อ Silver maple Nieuwkerk และคณะ (1986) พบว่า ยอดใหม่ที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดของแอปเปิ้ล ในอาหารเติม TDZ มีขนาดเล็กกว่าการเติม BA นอกจากนี้ TDZ ความเข้มข้นสูงส่งเสริมการสะสมแอนโธไซยานินในใบ แต่ในการศึกษานี้ไม่พบปรากฏการณ์ดังกล่าวคงมีเพียงการสร้างแคลลัสบริเวณฐานชิ้นส่วนที่สัมผัสอาหารและไม่มีการสร้างยอดรวม ในขณะที่ TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพียงยอดเดียวจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างและไม่มีการสร้างแคลลัส

นอกจากการเติมไซโตไคนินอย่างเดียวให้การสร้างยอดรวมได้ดีแล้วพบว่าการเติมร่วมกับออกซินให้การสร้างยอดรวมได้ดีเช่นกัน แต่ขึ้นกับชนิดส้ม (Singh *et al.*, 1994; Balch and Alejo, 1997;Moore, 1986) สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุนในการศึกษานี้พบว่า การเติม NAA ความเข้มข้นต่ำ 0.1-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารร่วมกับ BA ส่งเสริมเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอด ลำต้นเหนือใบเลี้ยงและตาข้าง

สูงกว่าการเพาะเลี้ยงปลายยอดส้มพันธุ์ Khasi mandarin (*C. reticulata* Blanco.) และพันธุ์ Assam lemon (*C. limon* Burm. F.) ในอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยให้ผลในทางตรงกันข้าม (Singh *et al.*, 1994) และในส้มบางพันธุ์ต้องการ NAA ความเข้มข้นสูงเพื่อชักนำยอดรวมเช่นการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงของต้นกล้า Maxican lime และ Mandarin พันธุ์ Monica พบว่าต้องการ NAA ความเข้มข้นสูงถึง 5.4 ไมโครโมลาร์ (Balch and Alejo, 1997) แตกต่างจากส้มโชกุนที่ตอบสนองต่อ NAA ความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้ในส้มบางพันธุ์เช่น Sour orange, Cleopatra mandarin และ Carrizo citrange ต้องการทั้ง NAA และ BA ความเข้มข้นสูงในการชักนำยอดรวม (Moore, 1986) สำหรับการเพาะเลี้ยงส่วนชิ้นส่วนตาข้างส้มโชกุนในการศึกษานี้ไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในการสร้างยอดรวม ในขณะที่การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงและปลายยอดต้องการ BA และ NAA ความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 9 และ 10) ส่วน BA และ NAA ความเข้มข้นสูง ไม่มีผลต่อการสร้างยอดรวมแต่สร้างแคลลัส และเมื่อย้ายเลี้ยงต่อไปก็เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงของส้ม Carrizo citrange ในอาหารเติม BA ความเข้มข้นสูง 22 หรือ 44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.5 หรือ 5.4 ไมโครโมลาร์ ให้การสร้างแคลลัสมากกว่าการสร้างยอดเมื่อเทียบกับการใช้ BA ความเข้มข้นต่ำกว่า (Moore, 1986) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มโชกุนในอาหารเติมไซโตไคนินอย่างเดียวหรือร่วมกับออกซินให้ยอดใหม่ที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณช้า เมื่อย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเติม GA_3 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ความยาวยอดเพิ่มขึ้น ในขณะที่ GA_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ความยาวยอดลดลง GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดมากที่สุด 1.03 ซม. ทำนองเดียวกับจำนวนใบต่อยอด GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบต่อยอดมากที่สุด 3.75 ใบ (ภาพที่ 10) ทำนองเดียวกับเพาะเลี้ยงไข่อ่อน Grapefriut (*C. paradisi* Macf.) ในอาหารเติม GA_3 เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้จำนวนยอดเฉลี่ย 8.3 ยอด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น GA_3 เป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลงเหลือ 8 ยอด (Moore, 1985) นอกจากนี้ GA_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากให้จำนวนยอดเฉลี่ยลดลงแล้วยังทำให้ยอดใหม่มีลักษณะยืดยาวผิดปกติ ใบเล็ก อาจเป็นเพราะความเข้มข้นสูงเกินไป จากการศึกษานี้พบว่า GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดใหม่มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการชักนำยืดยาวและเพิ่มจำนวนยอดที่ชักนำจากอาหารเติม BA อย่างเดียวหรือร่วมกับ NAA โดยเมื่อย้ายยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนและความยาวยอดได้ดีซึ่งให้การเพิ่มจำนวนยอดมากที่สุด 5.5 ยอด ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงยอดใหม่มะนาว (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2536)

3 การศึกษาผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนต่อการสร้างยอดรวม

อาหารสูตร MT ชักนำยอดรวมเฉลี่ย 54.27 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้การสร้างยอดรวมเฉลี่ย 46.81 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) เช่นเดียวกับจำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ย ทั้งนี้เพราะว่าองค์ประกอบของอาหารสูตร MT มีสารอินทรีย์มากกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งมีผลในการส่งเสริมการสร้างยอด นอกจากนี้สูตรอาหาร MT เป็นสูตรอาหารดัดแปลงมาจากสูตร MS เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโดยตรง (Murashige and Tucker, 1969 อ้างโดย Gill *et al.*, 1994) ดังนั้นจึงมีการใช้สูตรอาหารนี้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มพันธุ์ต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้ม Sour orange, Carrizo citrange และ Cleopatra mandarin (Moore, 1986) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้ม Carrizo citrange, Swingle citrumelo และ Key lime หลังเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อและคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน (Moore, 1992) นอกจากนี้ Ling และ Iwamasa (1997) ใช้อาหารสูตร MT เติม 2,4-D เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากข้าวมอล์ท 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเมล็ดที่ยังไม่แก่เต็มที่ของพืชตระกูลใกล้เคียงกับส้มเพื่อชักนำโซมาติคเอ็มบริโอจากเมล็ดโดยตรง และจากการศึกษานี้เมื่อพิจารณาชิ้นส่วนพืชต่อการสร้างยอดในอาหารสูตร MT ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ลำต้นเหนือใบเลี้ยงสร้างยอดได้ดีที่สุด รองลงมาคือตาข้างและปลายยอดตามลำดับ เพราะว่าชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงจากต้นกล้ามีการสะสมอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงจึงส่งเสริมการสร้างยอดได้ดี ส่วนชิ้นส่วนตาข้างในการทดลองนี้นำมาจากยอดที่ชักนำในหลอดทดลองอาจมีการสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตไว้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารจึงมีการสร้างยอดรวมได้ดีกว่าชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้จากต้นกล้า

4 การศึกษาผลของ NAA และ IBA ต่อการสร้างราก

โดยทั่วไปในขั้นตอนการชักนำรากจากยอดที่ชักนำในหลอดทดลองไม่มีความจำเป็นต้องการความเข้มข้นของธาตุอาหารครบ ทั้งนี้เพราะยอดใหม่สามารถสังเคราะห์แสงสร้างอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งมายังฐานยอดเพื่อใช้สร้างรากได้เอง เช่นเดียวกับการศึกษานี้พบว่าอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ให้การสร้างรากได้ดีกว่าอาหารสูตร MS ที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารครบ อย่างไรก็ตามการให้ยอดใหม่มีการสร้างรากเองต้องใช้เวลานานและคุณภาพรากไม่ดี ดังนั้นจึงมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยส่งเสริมการสร้างราก ซึ่งโดยทั่วไปในการชักนำรากจากยอดส้มมีการใช้ IBA และ NAA สำหรับการศึกษานี้พบว่า อาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากและจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 78.33 เปอร์เซ็นต์ และ 2.86 ราก (ตารางที่ 15) เช่นเดียวกับการชักนำรากจากยอดส้ม *C. limon* และ *C. jambhiri* ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร ให้การสร้างรากได้ดีในส้มทั้งสองชนิด (Raman *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตามการชักนำราก จากยอดส้ม Carrizo citrange เป็นไปได้ดีให้การสร้างราก 80 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารครบ เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนรากเฉลี่ย 10.2 ราก (Kitto and Young, 1981) ความสามารถในการสร้างรากแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของส้ม ส่วนการเติม IBA ในการศึกษานี้พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นสูง (2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพราะว่า IBA มีการสลายตัวเมื่อวางเลี้ยงในสภาพมีแสง ทำนองเดียวกับการชักนำรากจากยอดที่ชักนำจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าส้มส้มโอ (Goh *et al.*, 1995) และในการศึกษานี้พบว่า การใช้ NAA ความเข้มข้นสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสบริเวณโคนยอด (ภาพที่ 12) และเมื่อย้ายปลูกลงดินทำให้ส้มต้นใหม่มีการหักล้มบริเวณโคนยอดที่เกิดแคลลัส ในขณะที่การใช้ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากน้อยกว่าการเติม NAA อย่างเดียว (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ตรงกันข้ามกับการชักนำรากส้ม Kinnow mandarin และ Local sangtra mandarin (Gill *et al.*, 1994, 1995) ซึ่งเป็นไปได้ดีในอาหารเติมทั้ง NAA และ IBA อย่างไรก็ตามต้นกล้าที่ชักนำรากในอาหารเติม NAA เพียงอย่างเดียว ให้อัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน ทั้งนี้เพราะมีจำนวนรากมากกว่า ทำให้การดูดน้ำไปใช้ได้ดีกว่าจึงมีการตั้งตัวได้เร็ว

5 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

การใช้สารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีวัตถุประสงค์หลัก 3 ประการคือส่งเสริมการสร้างพืชต้นใหม่ กำจัดเชื้อ และเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน สารปฏิชีวนะที่เลือกใช้นั้นแตกต่างกันออกไปขึ้นกับพืช การใช้สารปฏิชีวนะในการปลูกถ่ายยีนกับส้มในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในสองประการหลัง ขั้นตอนการกำจัดเชื้อในการปลูกถ่ายยีนมีความจำเป็นเพราะว่า การเจริญเติบโตของเชื้อเร็วกว่าชิ้นส่วนพืชทำให้การเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนพืชไม่มี Shackelford และ Chlan (1996) ทดสอบสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ความเข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 และ EHA101 พบว่าโมซาแลคแทมสามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ EHA101 ได้ดีที่สุด ส่วนซีโฟทาซิมสามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA4404 ได้ดีที่สุด โดยไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัสและพืชต้นใหม่ ในการศึกษานี้ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 และ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดเชื้อได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมมากที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) การใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้มีผลให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมลดลง ในทำนองเดียวกับจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอด เช่นเดียวกับการทดลองปลูกถ่ายยีนในส้มชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่มีการใช้ซีโฟทาซิมอย่างเดียว เช่น Moore และคณะ (1992) รายงานการใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินที่เลี้ยงร่วมชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้ม Carrizo citrange, Swingle citrumelo และ Key lime ในขณะที่ Kaneyoshi และคณะ (1994) ใช้ซีโฟทาซิมความเข้มข้นสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการ

กำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกิน ที่เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มสามใบ นอกจากนี้ยังมีการใช้ซีโฟทาซิมร่วมกับสารปฏิชีวนะตัวอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ เช่น Pena และคณะ (1995a) ใช้ซีโฟทาซิมร่วมกับแวนโคมัยซินความเข้มข้นอย่างละ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกิน ที่เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้ม Carrizo citrange และ Pena และคณะ (1995b) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแวนโคมัยซินเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้ม Sweet orange ในกรณีของแอปเปิ้ลนั้นพบว่า คาร์เบนนิซิลิน มีโฟซิม และซีโฟทาซิม เข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยกำจัดเชื้อที่ปลูกถ่ายยีนได้แต่สารปฏิชีวนะ 2 ชนิดแรก ยับยั้งการสร้างยอดรวม ส่วนซีโฟทาซิมไม่มีผลดังกล่าว คงมีแต่ลดอัตราการสร้างยอดรวมเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (Gercheva *et al.*, 1997;Yepes and Aldwinchle, 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับส้มโชกุนในการศึกษานี้ไม่ได้ทดลองใช้สารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เพราะซีโฟทาซิมเพียงอย่างเดียวความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อโดยไม่มีผลต่อการสร้างยอดรวม

สารปฏิชีวนะที่ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกนั้นในการศึกษานี้ใช้คานามัยซิน ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบความเข้มข้นสูงกว่านี้ (150-200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ยับยั้งการสร้างยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากการทดลองในส้มสามใบ ซึ่งพบว่า คานามัยซิน เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมได้มากที่สุด การใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้ยับยั้งการสร้างยอดรวม 100 เปอร์เซ็นต์ (Kaneyoshi *et al.*, 1994) การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อคานามัยซินมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดพืช เช่น คานามัยซินเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากลำต้น Rubus ได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการสร้างยอดรวม (Hassan *et al.*, 1993) ผลของคานามัยซินในการศึกษานี้นอกจากยับยั้งการสร้างพืชต้นใหม่แล้วยัง พบว่า ใบที่พัฒนามีลักษณะบิดเบี้ยว ขอบใบมีสีซีด และมีการสูญเสียคลอโรฟิลล์จนใบซีดทั้งใบแล้วตายในที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองของ Sriskandarajah และคณะ (1994) พบว่า อาหารเติมคานามัยซินความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการสร้างแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนใบแอปเปิ้ลได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ใบมีลักษณะเหลืองซีด และตายหลังวางเลี้ยง 3 เดือน Yepes และ Aldwinckle (1994) วางเลี้ยงชิ้นส่วนใบแอปเปิ้ล ในอาหารเติมคานามัยซินความเข้มข้น 5-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการสร้างยอดรวม 10 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเติมคานามัยซิน 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการสร้างยอด และยอดใหม่ที่สร้างมีการสูญเสียคลอโรฟิลล์โดยเริ่มจากขอบใบและต่อเนื่องไปทั้งใบ เมื่อย้ายเลี้ยงต่อไปยอดใหม่ตาย สำหรับการคัดเลือกความสามารถในการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ลักษณะการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินไม่ประสบผลสำเร็จ ในการศึกษาผลของไฮโกรมัยซินทุกความเข้มข้นจากการศึกษานี้พบว่ายับยั้งการสร้างยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปชิ้นส่วนลำต้นมีสีซีด และตายในที่สุด อาจเป็น

เพราะว่าพืชตระกูลส้มไม่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะดังกล่าว จึงไม่มีการสร้างยอดรวม จากการทดลองที่ผ่านมาไม่มีรายงานการใช้ยีนคัดเลือกการต้านทานต่อไฮโกรมัยชินในระบบการปลูกถ่ายยีนในส้ม และที่สำคัญ พบว่า ไฮโกรมัยชิน มีการตอบสนองในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ดีกว่าพืชใบเลี้ยงคู่ ดังนั้นในการปลูกถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวส่วนใหญ่ใช้ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยชิน (Wilmink and Dons, 1993) ความเข้มข้นที่ใช้ต่ำเมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ เช่น การใช้ไฮโกรมัยชินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนในข้าวให้แคลลัสที่ต้านทานประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ (Rashid *et al.*, 1996) สำหรับการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนพืชใบเลี้ยงคู่อื่นๆ เช่น *Brassica juncea* ใช้ไฮโกรมัยชินเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมที่ต้านทาน 36 เปอร์เซ็นต์ (Pental *et al.*, 1993) ในขณะที่ในแตงกวา การใช้ไฮโกรมัยชินเข้มข้น 20-30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดใหม่ที่ต้านทานมากกว่าการใช้ความเข้มข้น 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nishibayashi *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลของไฮโกรมัยชินในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีการสร้างยอดรวม ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปอาจใช้ไฮโกรมัยชินความเข้มข้นต่ำกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน

6 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียยังมีหลายปัจจัย แต่ในการทดลองนี้มีการศึกษาผลของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความหนาแน่นเชื้อ วิธีการเลี้ยงร่วม จากสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมดพบว่า สายเชื้อ EHA101 ให้การสร้างยอดรวมในอาหารเติมคานามัยชินมากที่สุด 12.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ LBA4404 และ A13 ซึ่งให้การสร้างยอดรวม 11.61 และ 7.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาผลของความหนาแน่นเชื้อในการทดลองนี้ พบว่า สายเชื้อ EHA101 ความหนาแน่น $1.2x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้การสร้างยอดรวมในอาหารเติมคานามัยชินมากที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22) การเพิ่มความหนาแน่นเชื้อทำให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมลดลง เพราะความหนาแน่นเชื้อมากเกินไปทำให้การกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้แบคทีเรียมีการปลดปล่อยสารพิษไปมีผลยับยั้งการสร้างยอดและการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีประสิทธิภาพลดลง ทำนองเดียวกับการปลูกถ่ายยีนในส้ม Carrizo citrange (Pena *et al.*, 1995a,b) และเมื่อพิจารณาระหว่างสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ในการศึกษานี้ พบว่า การใช้ความหนาแน่นเชื้อ $1.2x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมในอาหารเติมคานามัยชินได้ดี ทั้งสองสายเชื้อเป็นไปในทำนองเดียวกัน แม้ว่าเดือนแรกของการเพาะเลี้ยงชุดเปรียบเทียบให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมมากกว่า แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 3 เดือน ต่อมา ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมมากกว่าชุดเปรียบเทียบ เพราะว่าสายเชื้อดังกล่าวมียีนต้านทานคานามัยชินเมื่อส่งถ่ายเข้าสู่ชิ้นส่วนพืชทำให้มีการสร้างยอดในอาหารเติมคานามัยชินได้ดีกว่าชุดเปรียบเทียบที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ เป็นไปในทำนองเดียวกับจำนวนยอดเฉลี่ย พบว่า ช่วงเดือนแรกของการเพาะเลี้ยงชุดเปรียบเทียบที่หยดด้วยอาหารเหลว

สูตร LB ให้จำนวนยอดมากที่สุด แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 3 เดือน สายเชื้อ EHA101 ความหนาแน่นเชื้อ $1.2x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด 1.7 ยอด (ตารางที่ 18) ความหนาแน่นเชื้อดังกล่าวให้จำนวนยอดเฉลี่ยได้มากที่สุดในการปลูกถ่ายยีนกับส้มโชกุน ทำนองเดียวกับการปลูกถ่ายยีนในส้มและพืชอื่นๆ มีการเลือกใช้ความหนาแน่นเชื้อใกล้เคียงกัน เช่นการปลูกถ่ายยีนในส้มสามใบ (Kaneyoshi *et al.*,1994) Walnut (Dandeker *et al.*, 1988) และการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้น Chickpea (Husnain *et al.*, 1997) ใช้ความหนาแน่นเชื้อเท่ากันคือ $5x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนก้านใบแตงกวา ใช้ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^{5}$ และ $1x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่ต้านทานคานามัยซินได้ 14 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Sarmento *et al.*, 1992)

ในการทดสอบสายเชื้อ LBA4404 และ A13 พบว่าความหนาแน่นเชื้อ $1.2x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ซึ่งใช้เวลาอินคิวเบท 24 ชั่วโมง) ให้การสร้างยอดรวมในอาหารเติมคานามัยซินมากที่สุด การใช้ความหนาแน่นเชื้อสูงกว่านี้อาจให้การสร้างยอดรวมมากกว่าจึงมีการเพิ่มความหนาแน่นเชื้อโดยการเพิ่มเวลาอินคิวเบทสายเชื้อ LBA4404 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้การสร้างยอดรวมในอาหารเติมคานามัยซินได้ดีกว่าเวลาอินคิวเบทเชื้อ 48 ชั่วโมง และให้ผลตรงกันข้ามกับสายเชื้อ A13 เป็นไปในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงเดือนที่ 2 และ 3 สอดคล้องกับการทดลองของ Toppi และคณะ (1997) ซึ่งรายงานการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นฟัก (*Cucurbita pepo* L.) โดยใช้เชื้อ *A. rhizogenes* การอินคิวเบทเชื้อเวลา 48 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีน 94 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการอินคิวเบทเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีน 60 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ในส่วนของ สายเชื้อ A13 การใช้เวลาอินคิวเบทน้อยให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดมากกว่าการใช้เวลานาน โดยการอินคิวเบทเชื้อเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเท่ากัน 16.66 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือ 11.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาอินคิวเบท 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 25) เป็นไปในทำนองเดียวกับการปลูกถ่ายยีนในเจอราเนียม (Pellegrineschi and Mariani, 1996) จากการศึกษานี้แม้ว่าสายเชื้อ LBA4404 ที่อินคิวเบท 72 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การปลูกถ่ายยีนสูงก็ตามแต่เมื่อพิจารณาจำนวนยอดเฉลี่ยการอินคิวเบทเชื้อเวลา 48 ชั่วโมง ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่การอินคิวเบทเชื้อเวลาดังกล่าวทำให้ความหนาแน่นเชื้อเหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน

ส่วนการศึกษาวิธีการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียในการศึกษานี้พบว่า วิธีการหยด ให้การสร้างยอดรวมในอาหารเติมคานามัยซินมากกว่าการจุ่มแช่ ต่างจากการปลูกถ่ายยีนในส้ม Carrizo citrange ซึ่งพบว่า วิธีการจุ่มแช่ ให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนได้ดีกว่า (Pena *et al.*, 1995a) เพราะความหนาแน่นเชื้ออาจเหมาะสม ทำให้การส่งถ่ายยีนมีประสิทธิภาพ ในขณะที่การจุ่มแช่อาจทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดสภาวะเครียดเพราะความหนาแน่นเชื้อมากเกินไปการกำจัดเชื้อต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นทำให้เชื้อมีการปล่อยสารพิษมากขึ้นมีผลยับยั้งการสร้างยอดรวม เป็นไปในทำนองเดียวกับจำนวนยอดเฉลี่ยที่ต้านทานต่อคานามัยซิน ซึ่งพบว่า การเลี้ยงร่วมโดยวิธีการหยด ให้จำนวนยอดเฉลี่ยที่ต้านทานคานามัยซินมากกว่าการจุ่มแช่ สายเชื้อ EHA101 ให้จำนวน

ยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2 ยอด (ตารางที่ 20) รองลงมาคือสายเชื้อ LBA4404 และ A13 ตามลำดับ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการปลูกถ่ายยีนในส้ม Sweet orange ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีน 7.9 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดเฉลี่ยที่ต้านทานคานามัยซิน 0.64 ยอด (Pena *et al.*, 1995b) ส่วนการปลูกถ่ายยีนในส้ม Carrizo citrange, Swingle citrumelo และ Key lime ด้วยวิธีการเดียวกันนี้ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนมี 8 เปอร์เซ็นต์ ส้ม Swingle citrumelo มีการสร้างยอดที่ต้านทานคานามัยซินได้มากที่สุด 3.44 ยอด รองลงมาคือ ส้ม Carrizo citrange และ Key lime มีการสร้างยอดได้ 2.34 และ 1.69 ยอด ตามลำดับ (Moore *et al.*, 1992)

นอกจากการตรวจสอบการปลูกถ่ายยีนโดยการคัดเลือกการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีการคัดเลือกโดยกิจกรรมของ GUS แต่จากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ในการศึกษานี้ไม่พบการแสดงออก อาจเป็นไปได้ที่มีการปลูกถ่ายยีนเข้าไปได้แต่โปรโมเตอร์ของ GUS มีกิจกรรมต่ำ มีเฉพาะยีนต้านทานคานามัยซินอย่างเดียว ซึ่งทำให้ยอดใหม่ส้มมีการต้านทานคานามัยซินได้ระดับหนึ่ง โดย สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ให้ยอดใหม่มีความต้านทานคานามัยซินได้ดีที่สุด โดยเฉพาะความหนาแน่นเชื้อ $1.2x10^{7}$ และ $1.2x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ยอดใหม่ที่เลี้ยงและไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีการชีดของใบและตายในที่สุดเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติมคานามัยซินเป็นเวลานาน ทำนองเดียวกับการปลูกถ่ายยีนในส้ม Carrizo citrange, Swingle citrumelo และ Key lime พบว่า ยอดใหม่มีใบชีดเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเติมคานามัยซิน และเมื่อตรวจสอบกิจกรรมของ GUS มีการแสดงออก ในขณะที่ยอดที่มีใบเขียวปกติ ไม่พบการแสดงออกกิจกรรมของGUS (Moore *et al.*, 1992) การต้านทานที่พบในการศึกษานี้อาจเป็นการปรับตัวต่อสภาวะเครียดของสารปฏิชีวนะ ไม่ได้เป็นการต้านทานจากการปลูกถ่ายยีน ซึ่ง Wilmink และ Dons (1993) รายงานว่าคานามัยซินที่ใช้สามารถจับตัวกับอิออนที่เป็นไบวาเลนท์ของแคลเซียมและแมกนีเซียม ในสภาพที่มี pH ต่ำกว่า 6 ในขณะที่การทดลองครั้งนี้อาหารเพาะเลี้ยงมี pH 5.8 ปรากฏการณ์ข้างต้นอาจเป็นไปได้เช่นเดียวกัน

ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ที่อินคิวเบทเป็นเวลา 0 และ 48 ชั่วโมง ให้การต้านทานคานามัยซินได้ดี ส่วนชุดเปรียบเทียบมีการตายของยอด 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 27) และการอินคิวเบทเป็นเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ให้การต้านทานคานามัยซินได้น้อย อาจเป็นเพราะว่ามีความหนาแน่นของเชื้อมากเกินไป ไม่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืช ทำให้พืชเกิดสภาวะเครียด และมีการตาย และการศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วม พบว่า มีเพียงยอดใหม่ที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 โดยวิธีการหยดเชื้อ ต้านทานคานามัยซินได้ดี และจากการทดลองนี้พบว่า ชุดเปรียบที่หยดและจุ่มแช่มีความต้านต่อคานามัยซินได้ดีกว่าการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ เพราะอาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีองค์ประกอบของธาตุแมกนีเซียมโดยเฉพาะสูตร YEB ทำให้ไปจับตัวกับคานามัยซิน จึงอาจส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชต้านทานคานามัยซินได้ระดับหนึ่งและมีการสร้างยอดเกิดขึ้น

จากการปลูกถ่ายยีนในส้มโชกุนในการศึกษานี้ไม่ได้ส้มจำลองพันธุ์ ถึงแม้มีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนในส้มชนิดอื่นๆ ก็ตาม เพราะว่าส้มต่างชนิดกันมีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกได้ต่างกัน ในการทดลองนี้ใช้คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน เพราะส้มโชกุนมีความต้านทานคานามัยซินได้ต่ำ ต่างจากส้มชนิดอื่นที่มีรายงานความสำเร็จโดยใช้คานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน (Moore, 1992 ; Pena *et al.*, 1995a,b) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าส้มโชกุนมีการตอบสนองต่อสายเชื้อ EHA101 ได้ดีกว่าสายเชื้ออื่นๆ เพื่อเพิ่มความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนในการศึกษาครั้งต่อไปอาจเพิ่มความเข้มข้นคานามัยซินเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้ acetosyringone เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งอาจใช้วิธีการเลี้ยงร่วมโดยวิธีการอื่นๆ นอกเหนือจากการทดลองนี้ เช่น การใช้อัลตราโซนิค หรือเครื่องดูดสูญญากาศ ช่วยกระตุ้นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืช

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุนและการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

1. อาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การสร้างยอดรวมจากเมล็ดได้มากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์

2. สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินในรูป BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์

3. BA ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนต่างๆ ได้ดีกว่า TDZ โดย BA เข้มข้น 0.5, 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และปลายยอด ได้มากที่สุด 78.48 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนตาข้างมีการสร้างยอด 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

4. อาหารสูตร MT ให้การสร้างยอดรวมได้ดีกว่าอาหารสูตร MS และการเติม BA อย่างเดียว พบว่า ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอด และลำต้นเหนือใบเลี้ยง ได้มากที่สุด 85 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนตาข้างสร้างยอดรวมได้ 58.33 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดใหม่จากชิ้นส่วน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายยอด และตาข้าง ที่ชักนำจากอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5, 0.3 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีการเพิ่มปริมาณยอดได้ดีที่สุด เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม GA_3 เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนการเติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดมากที่สุด 97.50 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.01 ยอด และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้มากที่สุด 72.50 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 1.53 ยอด ส่วน BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนตาข้างได้มากที่สุด 47.50 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 0.95 ยอด กลุ่มยอดใหม่จากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร จากตาข้างที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากปลายยอดที่ชักนำในอาหารเติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุด 5.90 4.40 และ 4.23 ยอด ตามลำดับ เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA และ GA_3 ความเข้มข้นอย่างละ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. อาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากและการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกลงดินมากที่สุด 78.33 และ 93.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

6. ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และให้การสร้างยอดรวมได้สูงที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ การใช้ซีโฟทาซิมความเข้มข้นดังกล่าวร่วมกับคานามัยซินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างยอดรวมได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 0.60 ยอด และเหมาะสมในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนดีที่สุด ในขณะที่การใช้ร่วมกับไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการสร้างยอดรวมและไม่เหมาะสมในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน

7. อะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1.2x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดในการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง โดยให้เปอร์เซ็นต์ที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้มากที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ต้องการความหนาแน่นเชื้อสูงกว่าโดยการอินคิวเบทเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุดต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยให้เปอร์เซ็นต์และจำนวนยอดเฉลี่ยที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้มากที่สุด 46.66 เปอร์เซ็นต์ และ 1.04 ยอด และสายเชื้อ A13 ที่อินคิวเบทเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด 16.66 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดที่ต้านทานคานามัยซินได้ 0.57 ยอด อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อความหนาแน่นสูงร่วมกับการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานให้ยอดใหม่ตายเร็วกว่าการใช้เชื้อความหนาแน่นต่ำ

8. การเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยวิธีการหยดเชื้อให้เปอร์เซ็นต์ยอดที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้มากกว่าการเลี้ยงร่วมโดยวิธีการจุ่มแช่

9. ไม่พบกิจกรรมของ GUS ในยอดใหม่ที่สร้างจากการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียสายเชื้อต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540. สถิติการปลูกไม้ผลและไม้ยืนต้น ปี 2537. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

นิวัตร์ ธรรมภิบาล และ ชนิษฐา วิเมศ. 2540. ส้ม ธุรกิจหมื่นล้านพัฒนาอย่างไรให้ยั่งยืน ว. เคหการเกษตร 5: 42-76.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวณีย์ สุพุทธิธาดา และสุมน มาสุธน. 2531. การเกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในส้มโอ. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 21: 367-374.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2540. ส้มโอ ไม้ผลทางเลือกที่ยังมีอนาคต ว.เคหการเกษตร 2: 85-91.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2536. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะนาว แก่นเกษตร 21: 36-48.

มงคล แซ่หลิม. 2535. การผลิตส้ม. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วันทนา นวรังสรรค์. 2538. การจำแนกพืชในสกุล *Lansium* โดยใช้ไอโซไซม์และการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สธน เสนาสวัสดิ์. 2534. การขยายพันธุ์ลองกองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์. 2527. โรคส้มในฤดูฝน. พืชสวน. 19: 129-135.

อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, สุพัฒน์ อรรถธรรม และนิพนธ์ ทวีชัย. 2526. โรคส้มในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alt, M.J., Heinemeyer, W. and Schroeder, J. 1990. The Vir-D genes from the region of the Ti plasmid T region border dependent processing steps in different rec mutants of *Escherichia coli*. Gene 96: 43-49.

Balch, M.P.E., and Alejo, O.N. 1997. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Mandarin by direct organogenesis. HortScience 32: 931-934.

Barlass, M. and Skene, K.G.M. 1982. *In vitro* plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. Scientia Horticulturae 17: 333-341.

Beloualy, N. 1991. Plant regeneration from callus culture of three Citrus rootstocks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24: 29-34.

Bhat, S.R., Chitralekha, P. and Chandel, K.P.S. 1992. Regeneration of plants from long-term root culture of lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 19-25.

Dandekar, A.M., Martin, L.A. and McGranahan, G. 1988. Genetic transformation and foreign gene expression in Walnut tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113: 945-949.

Duran-Vila, N., Ortega, V. and Navarro, L. 1989. Morphogenesis and tissue culture of three *Citrus* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 123-133.

Edriss, M.H. and Burger, D.W. 1984. *In vitro* propagation of troyer citrange from epicotyl segments. Scientia Horticulturae 23: 159-162.

Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. and Gosal, S.S. 1994. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenora). Journal of Horticultural Science 69: 231-236.

Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B.S. and Gosal, S.S. 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) Scientia Horticulturae 63: 167-174.

Gmitter, F.G.Jr., Grosser, J.W. and Moore, G.A. 1992. Citrus. *In* Biotechnology of Perennial Fruit Crops. (eds. F.A. Hammerschlag and R.E. Litz) pp. 335-369, Wallingford: C.A.B. International

Goh, C.J., Sim, G.E., Morales, C.L. and Loh, C.S. 1995. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pomelo tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 301-303.

Hammershlag, F.A., Zimmerman, R.H., Yadava, U.L., Hunsucker, S. and Gercheva, P. 1997. Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from Apple leaf explants and on shoot regeneration. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 758-763.

Harada, H. and Murai, Y. 1996. Clonal propagation of *Poncirus trifoliata* through culture of shoot primodia. Journal of Horticultural Science 71: 887-892.

Hassan, M.A., Swartz, H.J., Inamine, G. and Mullineaux, P. 1993. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several Rubus genotypes and recovery of transformation plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 9-17.

Huetteman, C.A. and Preece, J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 105-119.

Husnain, T., Malik, T., Riazuddin, S. and Gordon, M.P. 1997.Studies on the expression of marker gene in chickpea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 7-16.

Jong, J.D., Rademaker, W. and Wordragen, F.V. 1993. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 263-270

Kaneyoshi, (Hiramatsu) J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N. and Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13: 541-545.

Kim, M.S., Schumann, C.M. and Klopfenstein, N.B. 1997. Effect of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clone. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 45-52.

Kitto, S.I. and Young, M.J. 1981. *In vitro* propagation of carrizo citrange. HortScience 16: 305-306.

Kosuge, T., Meredith, C.P. and Hollaender, A. 1982. Genetic engineering of plant : An Agricultural Perspective New York : Plenum Press. 499 p.

Maggon, R. and Singh, B.D. 1995. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.). Scientia Horticulturae 63: 123-128.

Martin, G.C., Miller, A.N., Castle, L.A., Morris, J.W.,Morris, R.O. and Dandekar, A.M. 1990. Feasibility studies using β-glucuronidase as a gene fusion marker in apple, Peach and Radish. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 686-691.

Moore, G.A. 1985. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 66-70.

Moore, G.A. 1986. *In vitro* propagation of *Citrus* rootstocks. HortScience 21: 300-301.

Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, S.D. and Cline, K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 11: 238-242.

Navarro, L., Roistacher, C.N. and Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 471-479.

Navarro, L. 1984. Citrus tissue culture. *In* Micropropagation of Selected Rootcrops, Palm, Citrus and Ornamental Species. (ed. Joint FAO/IAEA Food and Agriculture Organization of the United Nations) pp. 113-154 Rome : IAEA.

Nieuwkerk, J.P.V., Zimmerman, R.H. and Fordham, I. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. HortScience 21: 516-518.

Nishibayashi, S., Kaneko, H. and Hayakawa, T. 1996. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plant using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. Plant Cell Reports 15:809-814.

Nito, N. and Iwamasa, M. 1990. *In vitro* planlet formation from juice vesicle callus of satsuma (*Citrus unshiu* Marc.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 137-140.

Pawlicki, N., Sangwan, R.S. and Norreel, S.S. 1992. Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 129-139.

Pellegrineschi, A. and Mariani, O.D. 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of scented geranium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 79-86.

Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Ortega, C., Pina, J.A., Duran-vila, N. and Navarro, L. 1995a. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. Plant Science 104: 183-191.

Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Ortega, C., Pina, J.A., Duran-vila, N. and Navarro, L. 1995b. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 14: 616-619.

Pental, D., Pradhan, A.K., Sodhi, Y.S. and Mukhopadhyay, A. 1993. Variation amongst *Brassica juncea* cultivars for regeneration from hypocotyl explants and optimization of conditions for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Plant Cell Reports 12:462-467.

Pickardt, T., Meixner, M., Schade, V. and Schieder, O. 1991. Transformation of *Vicia narbonensis* via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell Reports 9:535-538.

Preece, J.E., Huetteman, C.A., Ashby, W.C. and Roth, P.L. 1991. Micro and cutting propagation of silver maple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:142-148.

Raman, H., Gosal, S.S. and Brar, D.S. 1992. Plant regeneration from callus cultures of *Citrus limon* and *Citrus jambhiri*. Crop Improvement 19: 100-103.

Rashid, H.,Yokoi, S., Toriyama, K. and Hinata, K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. Plant Cell Reports 15:727-730.

Sarmento, G.G., Alpert, K., Tang, F.A. and Punja, Z.K. 1992. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of Kanamycin resistance in pickling cucumber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 185-193.

Shackelford, N.J. and Chlan, C.A. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology Reporter 14: 50-57.

Sim, G.E., Goh, C.J. and Loh, C.H. 1989. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco multiple bud formation from shoot and explants in the presence of 6-benzylaminopurine. Plant Science 59: 203-210.

Singh, S., Ray, B.K., Bhattacharyya, S. and Deka, P.C. 1994. *In vitro* propagation of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm.f. HortScience 29: 214-216.

Sriskandarajah,S., Goodwin, P.B. and Speirs, J. 1994. Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 317-329.

Steck, T.R., Lim,T.S. and Kado, C.L. 1990. Vir D2 gene product form the nopaline plasmid pTiC58 has at least two activities required for virulence. Nucleic Acid Res. 18: 6952-6958.

Tapiti, D., Mitra, G.C. and Chatterjee, A. 1995. Micropropagation of *Citrus sinensis* Var. Mosambi -an important scion. Phytomorphology 45: 57-64.

Toppi, L.S.D., Pechioni, N. and Durante, M. 1997. *Cucurbita pepo* L. can be transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 89-93

Torres, A.C., Cantliff, D.J., Laughner, B., Bienick,M., Nagata, R., Arhraf, M. and Ferl, R.J. 1993. Stable transformation of lettuce cultivar south bay from cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 279-285.

Wilmink, A. and Dons, J.J.M. 1993. Selective agent and Marker genes for use in transformation of Monocotyledonous plants. Plant Molecular Biology Reporter 11:165-185.

Yepes, L.M. and Aldwinckle, H.S. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 257-269.

ภาคผนวก

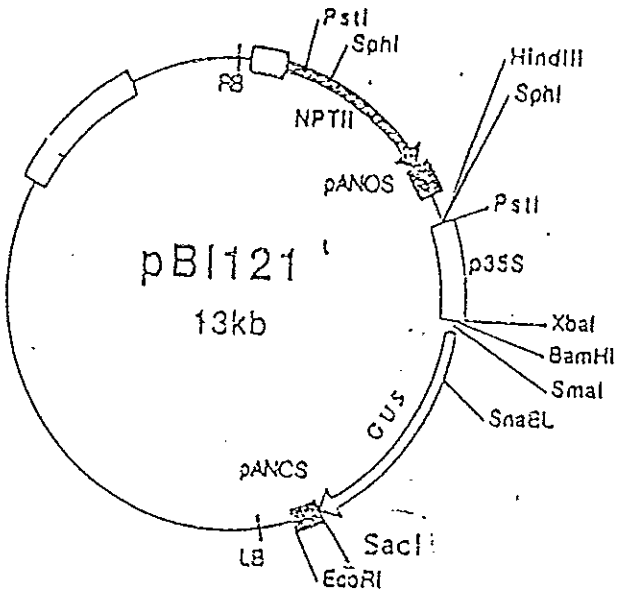
ภาคผนวกที่ 1. องค์ประกอบของอาหารสูตร MS และ MT

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	MT
1. ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.00	1,650.00
KNO_3	1,900.00	1,900.00
KH_2PO_4	170.00	170.00
$CaCl_2 2H_2O$	440.00	440.00
$MgSO_4 7H_2O$	370	370
2. ธาตุอาหารรอง		
KI	0.83	0.83
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4 H_2O$	16.90	16.90
$ZnSO_4 7H_2O$	10.60	10.60
$CuSO_4 5H_2O$	0.025	0.025
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25	0.25
$CoCl_2 6H_2O$	0.025	0.025
3. ธาตุเหล็ก		
$FeSO_4 7H_2O$	27.80	27.80
Na_2EDTA	37.30	37.30
4. สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.00	-
Nicotinic acid	0.50	2.462
PyridoxineHCl	0.50	2.467
ThiamineHCl	0.10	10.119
Glycine	2.00	1.953

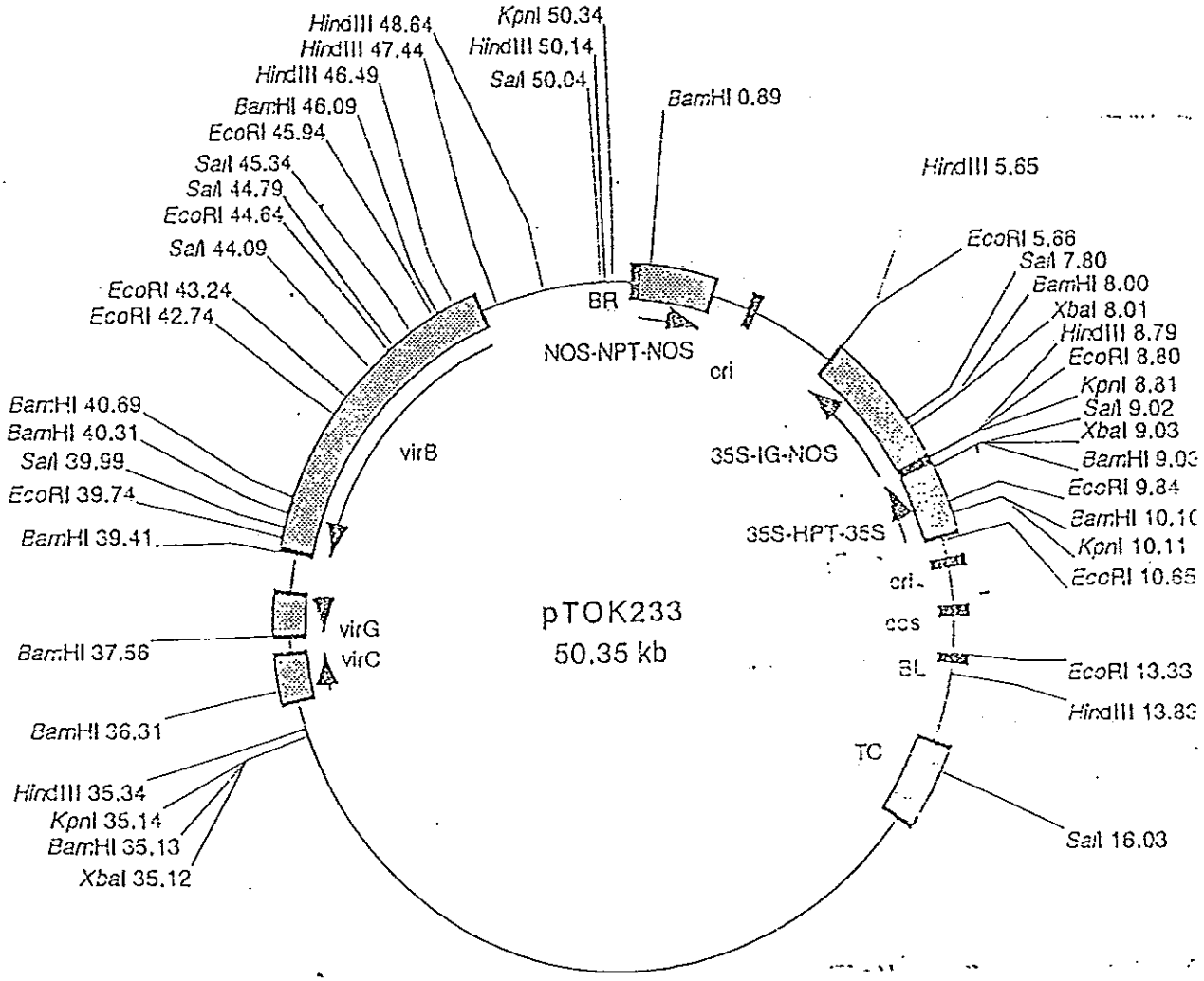
ภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	MT
Folic acid	-	0.098
Riboflavin	-	0.098
Biotin	-	0.098
Ascorbic acid	-	5.284
Sucrose	30,000.00	30,000.00

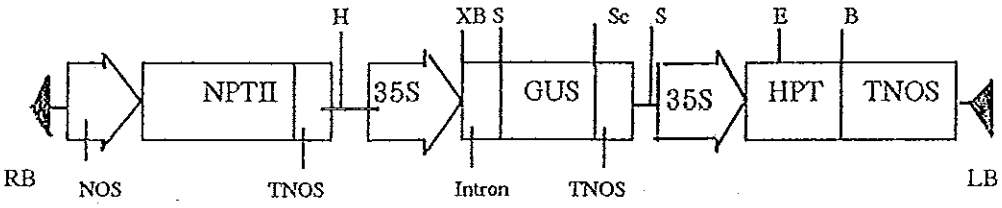
ภาคผนวกที่ 2. โครงสร้างของพลาสมิด pBI121



ภาคผนวกที่ 3 โครงสร้างของพลาสมิด pTok233



ภาคผนวกที่ 4. โครงสร้างพลาสมิด pIG121



ภาคผนวกที่ 5. องค์ประกอบของสูตรอาหาร YEB สำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
beef extract	8,310.00
yeast extract	1,000.00
peptone	5,060.00
sucrose	5,000.00
$MgSO_4 7H_2O$	240.00
Agar	800-1,500.00

ภาคผนวกที่ 6. องค์ประกอบของอาหารสูตร AB สำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
K_2HPO_4	3,000
NaH_2PO_4	1,000
NH_4Cl	1,000
$MgSO_4 7H_2O$	300
KCl	150
$CaCl_2$	10
$FeSO_4 7H_2O$	2.5
glucose	5.0
Agar	1,500

ภาคผนวกที่ 7. องค์ประกอบของอาหารสูตร LB สำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Tryptone	10,000
Yeast extract	5,000
Nacl	10,000
Agar	15,000

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสนธยา หนูด้วง
วัน เดือน ปี เกิด	18 พฤศจิกายน 2514

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	2538