การเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.)

Callus Culture of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and Gene Transformation with Agrobacteria (*Agrobacterium* spp.)

เริ่มอรุณ รักเผือก

Rermarun Rakphurk

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QK720 .T85 2541 ก.2

Bib Key 151095

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.)
ผู้เขียน	นางสาว เริ่มอรุณ รักเผือก
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)	(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)
	.....กรรมการ
	(ดร. รพีพร โสตถิพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.)
ผู้เขียน	นางสาวเริ่มอรุณ รักเผือก
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2541

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุด ประกอบด้วยการเตรียมใบอ่อนสีแดง ความเข้มข้นของอาหาร ระยะเวลาการเติมอาหารเหลว และชนิดของไซโตไคนิน สำหรับการศึกษาปัจจัยของการปลูกถ่ายยีนเป็นการศึกษาผลของซีโฟทาซิม และคานามัยซินต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส ชนิดของสายเชื้อ และเวลาเลี้ยงร่วมที่เหมาะสม ความหนาแน่นของเชื้อ และวิธีการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส จากการศึกษาพบว่า การเติมอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งเติม NAA (naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA (benzyladenine) และ TDZ (thidiazuron) ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร บนอาหารแข็งสูตร WPM (woody plant medium) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มตารวม และเปอร์เซ็นต์ใบอ่อนสีแดงสูงสุด ใบอ่อนสีแดงที่ได้จากสูตรอาหารดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด หลังจากย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 ปริมาณของแคลลัสเพิ่มขึ้น และพัฒนาเป็นโนดูลาแคลลัส แคลลัสมีสีเขียวหรือสีเหลือง ช่วงการเจริญเติบโตของแคลลัสมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วลักษณะเป็นเส้นตรงหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15-25 วัน โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุดหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน ช่วงเวลาดังกล่าวมีความเหมาะสมในการปลูกถ่ายยีน การเติมซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อส่วนเกินหลังการเลี้ยงร่วม ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและส่งเสริมการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสได้สูงสุด คานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการคัดเลือกโนดูลาแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 6.25 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำการสร้างยอดได้ ในขณะที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ ทำให้โนดูลาแคลลัสไม่มีชีวิตรอด ระหว่างสายเชื้อต่างๆ ของอะโกรแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ พบว่า *Agrobacterium tumefaciens* เฉพาะสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ส่งเสริมให้โนดูลาแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซิน 2.5 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมที่สุดคือ 24 ชั่วโมง และความหนาแน่นของเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส 9.8×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 25 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์สร้างยอดเฉลี่ย 15.62 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการใช้เครื่องอัลตราโซนิค เป็นเวลา 10 วินาที ในการกระตุ้นการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์

และเปอร์เซ็นต์สร้างยอดเฉลี่ย 21.87 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนด้วยวิธีการเนื้อเยื่อเคมี ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์กลูเคอโรนิเดส (GUS) ดังนั้นการตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนจึงใช้ความต้านทานต่อคานามัยซินเพียงอย่างเดียว

Thesis Title	Callus Culture of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and Gene Transformation with Agrobacteria (*Agrobacterium* spp.)
Author	Miss Rermarun Rakphurk
Major Program	Plant Science
Academic Year	1998

Abstract

Various factors affecting callus induction and proliferation in the culture of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) were studied. Those factors included young red leaf preparation, medium concentration, period of medium supplementation, and types of cytokinins. In the case of gene transformation, the effect of cefotaxime and kanamycin on the percentage of recovery and shoot formation from nodular calluses were investigated. Strain of agrobacteria and period of co-culture, densities of agrobacteria and methods of co-culture were also carried out. The results showed that addition of half strength liquid Murashige and Skoog (1/2 MS) medium supplemented with 0.06 mg/l NAA (naphthaleneacetic acid) and BA (benzyladenine) in combination with TDZ (thidiazuron) at the same concentration of 0.03 mg/l onto solid WPM (woody plant medium) for 2 weeks after culture gave the highest number of shoots and young red leaves. The leaves obtained from the above culture gave the highest percentage of callus formation after subculture for 2 passages. The color of the callus was green or yellow. After 15-25 days of culture, exponential growth of the callus was observed and the maximum growth was found at 25 days of culture. This peak was also optimal for gene transformation. Cefotaxime at a concentration of 200 mg/l was suitable for decontamination of excess agrobacteria after co-culture and gave the highest recovery of nodular callus and shoot formation. Transformed nodular calluses were selected by kanamycin at a concentration of 50 mg/l. At this concentration, 6.25% of nodular callus can survive while higher concentration cause the death of callus. Among strains of agrobacteria tested, *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 containing pBI 121 gave kanamycin resistant callus at 2.5% . Period of co-culture with agrobacteria at density of 9.8×10^9 cells/ml for 24 hours optimized gene transformation. Recovery of nodular callus and shoot bud formation were 25 and 15.62%, respectively. The use of ultrasonic for 10 seconds provided the best results for gene transformation. During this investigation, a

histochemical study was also carried out but β-glucuronidase (GUS) activity was not found. Accordingly, gene transformation was only detected by resistance of nodular callus to kanamycin.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการเรียน การเขียน การทำวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี ดร. รพีพร โสตถิพันธุ์ กรรมการสอบที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และมูลนิธิ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณ เจ้าหน้าที่ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ทุกๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้ความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชวัญจิตร สันติประชา อาจารย์เปลื้อง และ ร.ต.อ หญิง พินทุ สุวรรณมณี ที่ให้คำแนะนำในการศึกษา และให้กำลังใจมาตลอด และขอบคุณ คุณวิทูล ไชยภักดี ที่กรุณาให้คำแนะนำการใช้คอมพิวเตอร์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ให้การศึกษาและอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณ พี่ และน้องที่คอยสนับสนุน ตลอดจนเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจในการศึกษาจนสำเร็จการศึกษา

เริ่มอรุณ รักเผือก

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	9
2. วิธีการวิจัย	10
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	10
วิธีดำเนินการ	13
3. ผล	19
4. วิจารณ์	51
5. สรุป	60
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	67
ประวัติผู้เขียน	71

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด	20
2. ผลของระยะเวลาการเติมอาหารเหลว 1/2 MSNB ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด	22
3. ผลของชนิดไซโตไคนินต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด	25
4. ผลของสูตรอาหารที่ใช้เตรียมเลี้ยงกลุ่มยอดรวมต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสจากใบ	29
5. ผลของสูตรอาหารที่ใช้เตรียมกลุ่มยอดรวมต่อขนาดของแคลลัสที่พัฒนาจากใบ	29
6. ผลของสูตรอาหารที่เตรียมเลี้ยงกลุ่มยอดรวมต่อชนิดและสีของแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนต่างๆ ของใบ	32
7. การเจริญเติบโตของแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลา 30 วัน	34
8. ผลของซีโฟทาซิมต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สร้างยอดของโนดูลาแคลลัส	36
9. ผลของคานามัยซินต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สร้างยอดของโนดูลาแคลลัส	39
10. ผลของสายเชื้อและเวลาในการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส	42
11. เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสที่ความหนาแน่นของเชื้อ 3 ระดับ บนอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	47
12. ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมโดยใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลาต่างๆ ต่อการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง 6 สัปดาห์	49

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะของใบจากต้นกล้ามังคุดที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ	15
2.	ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง	21
3.	ผลของระยะเวลาการเติมอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง	23
4.	ผลของไซโตไคนินต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง	26
5.	ลักษณะใบจากกลุ่มตารวมวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM (ก) และ WPM เติมอาหารเหลว 1/2 MS มี BA (ข) TDZ (ค) และ BA ร่วมกับ TDZ (ง)	27
6.	แคลลัสของใบจากกลุ่มยอดรวมที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ ก่อนนำมาชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MSBT	30
7.	รูปแบบการสร้างแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบมังคุดในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	31
8.	แคลลัสที่มีโครงสร้างแบบเกาะตัวอย่างหลวม ๆ บริเวณโคนใบและแผ่นใบ	33
9.	รูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัสมังคุดในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน	34
10.	ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส	37
11.	ผลของคานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน	40
12.	ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายเชื้อและเวลาการเลี้ยงร่วม	43
13.	โนดูลาแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) และสายเชื้อ A13 (pBI 121) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร	44
14.	โนดูลาแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 (pTok 233) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร	45
15.	โนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้น อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร	46

16. โนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตและการสร้างยอด ในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อต่างกัน 48
17. ผลของอัลตราโซนิคต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัส ในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 50

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA/BAP	=	benzyladenine/ benzylaminopurine
DMRT	=	Duncan's new multiple range test
GUS	=	β-Glucuronidase
IAA	=	indoleacetic acid
IBA	=	indolebutyric acid
KN	=	kinetin
MS	=	Murashige and Skoog (medium)
MT	=	Murashige and Tucker (medium)
NAA	=	naphthaleneacetic acid
PG	=	phluroglucinol
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
Ri	=	root inducing
SAS	=	statistic analysis system
T-DNA	=	transfer DNA
TDZ	=	thidiazuron
Ti	=	tumour inducing
WPM	=	woody plant medium
X-gluc	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
YEB	=	yeast extract broth

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) อยู่ในตระกูล Guttiferae เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญพืชหนึ่งซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนชื้น แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันมากในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และพม่า (Yaacob and Tindall, 1995) สำหรับประเทศไทยปลูกกันมากทางภาคใต้ และ ภาคตะวันออก ผลผลิตที่ได้นอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศเช่น อังกฤษ เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ ฮ่องกง สิงคโปร์ และญี่ปุ่น (อารมณ์ อุดมสิน, 2537) มังคุดที่ปลูกในปัจจุบันมีเพียงพันธุ์เดียวคือ พันธุ์พื้นเมือง การปลูกมังคุดนิยมใช้วิธีการเพาะเมล็ดพันธุ์ แต่การขยายพันธุ์มังคุดด้วยเมล็ดพันธุ์มีข้อจำกัด คือ จำนวนเมล็ดพันธุ์ของมังคุดมีน้อยเพียง 0-2 เมล็ดต่อผล เมล็ดพันธุ์มังคุดจัดอยู่ในประเภทเมล็ดพันธุ์สด (recalcitrant seed) ซึ่งจะสูญเสียความงอกเร็วเมื่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ลดลง ทำให้เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ได้ไม่นาน เมล็ดพันธุ์มังคุดพัฒนาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัส ทำให้ไม่มีการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามลักษณะความแตกต่างที่พบเช่น ขนาดของผล ขั้วผล ใบ สีของเปลือกผล นั้นเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมที่ปลูกแตกต่างกัน เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ลักษณะดิน อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน (Yaacob and Tindall, 1995) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์มังคุดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การชักนำยอดโดยตรงจากใบ (Goh *et al.*, 1988; Goh *et al.*, 1994) และโดยผ่านเมอริสเต็มโนดูลาแคลลัสซึ่งชักนำจากใบก้านใบ และเมล็ดพันธุ์ (Te-chato *et al.*, 1995a และ 1995b) เพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้าที่ใช้ปลูกให้ได้เพียงพอต่อความต้องการ และ ใช้เป็นแหล่งวัสดุพืชในการปรับปรุงพันธุ์มังคุด เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสี สารเคมี รวมทั้งการใช้อะโกรแบคทีเรีย เป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่มังคุดเป็นต้น

การใช้อะโกรแบคทีเรียในการปลูกถ่ายยีนมังคุดเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์มังคุด เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการเช่น การต้านทานโรคและแมลง ยับยั้งการสร้างเอทธีลีน การทนแล้ง เปลือกบาง สร้างยางน้อย เป็นต้น จากการศึกษาชนิดของอะโกรแบคทีเรีย ที่มีความสามารถในการส่งถ่าย T-DNA (transferred DNA) เข้าสู่พืชพบว่ามีอยู่ 2 ชนิดคือ *Agrobacterium tumefaciens* มี Ti plasmid (tumor inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้างปุ่มปมในพืช และ *Agrobacterium rhizogenes* มี Ri plasmid (root inducing plasmid) ซึ่งส่งเสริมการสร้างรากลอยในพืช (Kosuge *et al.*, 1982) ปัจจุบันนิยมใช้อะโกรแบคทีเรีย ทั้ง 2 ชนิดในการส่งถ่าย T-DNA เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม (Moore *et al.*, 1992) แอปเปิ้ล (Norelli *et al.*, 1994) สำหรับในมังคุด ยังไม่มีรายงานการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อะโกร

แบคทีเรีย การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุดและประเมินความเป็นไปได้ในการปลูกถ่าย T-DNA เข้าสู่โนดูลาแคลลัสมังคุดโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์โดยการนำลักษณะอื่น ๆ ที่ต้องการเข้าสู่มังคุดต่อไป

การตรวจเอกสาร

1 ลักษณะทั่วไปของมังคุด

มังคุดเป็นไม้ผลยืนต้นที่มีการเจริญเติบโตช้า ต้นที่เจริญจากเมล็ดพันธุ์ตามธรรมชาติให้ผลผลิตเมื่อมีอายุประมาณ 6-12 ปี ความสูงของต้นประมาณ 6-25 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25-35 เซนติเมตร เปลือกของลำต้นมีสีน้ำตาลเข้ม ภายในเนื้อเยื่อของลำต้นมียางสีเหลือง (Yaacob and Tindall, 1995) ใบเป็นใบเดี่ยวรูปยาวรี หนา และเป็นมัน กว้างประมาณ 3-7 เซนติเมตร ยาว 15-18 เซนติเมตร ใบเกิดเป็นคู่ตรงกันข้าม (opposite) ทรงฟุ่มหนาทึบ ไม่ผลัดใบ ดอกมังคุดเกิดบริเวณปลายกิ่ง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบ รังไข่อยู่บนฐานรองดอก เกสรตัวผู้เป็นหมัน อยู่ล้อมรอบฐานรองดอก เกสรตัวเมียไม่มีก้านชูมีลักษณะเป็นแฉกติดกับรังไข่ ดอกมีอายุสั้น บานเวลาประมาณ 16.00-18.00 น. หลังดอกบาน 24 ชั่วโมง กลีบดอกจะร่วง (Lim, 1984) และเริ่มพัฒนาการเป็นผลอ่อน ผลเป็นแบบฉ่ำน้ำ (berry) เมื่อสุกเต็มที่มีสีม่วงมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-7 เซนติเมตร เปลือกหนาประมาณ 0.7-1.0 เซนติเมตร เนื้อผลเกิดจากเยื่อหุ้มไข่อ่อน (integument) เมล็ดพันธุ์มังคุดพัฒนามาจากเนื่อเยื่อนิวเซลลัส ซึ่งเป็นเนื่อเยื่อที่อยู่รอบถุงคัพภะ (embryo sac) สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่า 1 ต้น (polyembryonic seed) และเป็นเมล็ดพันธุ์สด ซึ่งจะสูญเสียความงอกได้รวดเร็วเมื่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ลดลง

2. การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลอง

สมปอง เตชะโต และวันทนา เอ้งย่อง (2531) ได้ศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณต้นกล้ามังคุดในระยะเวลาสั้นโดยการนำเมล็ดพันธุ์วางเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MS (Murashige and Skoog,1962) เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 20-50 ไมโครโมลาร์ ได้ต้นกล้าขนาดเล็กสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 20 ต้น ต่อชิ้นส่วน เมื่อย้ายต้นกล้าไปวางเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมลดความเข้มข้น BA ลงเหลือ 1 ไมโครโมลาร์ ทำให้ยอดยืดยาวขึ้น

Goh และคณะ (1988) ศึกษาการชักนำยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงมังคุด บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) WPM (woody plant medium) (McCown and Lloyd, 1981) และ B5 (Gamborg *et al.*, 1968) พบว่าอาหารสูตร WPM มีประสิทธิภาพในการชักนำยอดได้สูงสุด ใบที่มีอายุ 7-9 วัน และมีการแบ่งเป็น 2 ส่วน ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมได้สูงสุด และ ยอดรวมพัฒนามาจากบริเวณโคนใบมากกว่าปลายใบและบริเวณเส้นกลางใบมากกว่าแผ่นใบ

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2535) รายงานการเพาะเลี้ยงใบมังคุดบนอาหารสูตร WPM และสูตร MS พบว่าใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM สามารถชักนำการสร้างยอดได้ ส่วนอาหารสูตร MS ไม่มีผลต่อการสร้างยอด สำหรับชนิดของใบที่มีผลต่อการชักนำพืชต้นใหม่นั้น พบว่าใบอ่อนสีแดงที่ได้จากต้นกล้าซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3-4 เดือน ที่ทำการตัด

แบ่งชิ้นส่วนใบ โดยกรีดผ่านเส้นกลางใบพัฒนาให้ตุ่มตาสีเขียว หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงต่อมาอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตุ่มตาสีเขียวสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ ยอดเกิดบริเวณเส้นกลางใบค่อนมาทางโคนใบมากกว่าปลายใบ และไม่พบยอดบริเวณแผ่นใบ ส่วนใบสีเขียวไม่สามารถสร้างยอดได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 20, 50, 70 และ 100 ไมโครโมลาร์ ต่อการชักนำยอดโดยตรงจากใบพบว่า ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดจากใบอ่อนสีแดงและความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด ส่วนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ไม่พบการสร้างยอด

สมปอง เตชะโต และคณะ (2535) ศึกษาการชักนำยอดรวมจากใบอ่อนสีแดงของมังคุด โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส พบว่าการเพาะเลี้ยงใบในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA (1-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างกลุ่มตารวมสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนตายอดสูงสุดเฉลี่ย 40.37 ยอดต่อใบ ตายอดส่วนใหญ่สร้างจากปลายแผ่นใบเริ่มจากขอบใบแผ่นใบ และมีหนาแน่นเป็นกระจุกตรงปลายใบ

Goh และคณะ (1994) ชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงของมังคุด พบว่าใบอ่อนอายุประมาณ 10 วัน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และใบอ่อนจากต้นกล้าในแปลงปลูกอายุ 1 ปี ตัดแบ่งตามขวางขนาด 3 มิลลิเมตร ให้การสร้างยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 8 และ 45 ยอดต่อใบ ตามลำดับ เมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ยอดยืดยาวได้ดีเมื่อตัดแยกไปวางเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเติม BA 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อยอดมีความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร ตัดแยกไปชักนำรากในอาหารเติม IBA (indolebutyric acid) สามารถชักนำรากได้ 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 1 รากต่อต้น

Normah และคณะ (1995) ศึกษาการชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดพันธุ์มังคุด โดยตัดแบ่งเมล็ดพันธุ์ออกเป็น 6 ชิ้น แล้ววางเลี้ยงบนอาหาร 2 สูตร คือสูตร MS และ WPM เติม BA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ NAA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ มีและไม่มีผงถ่าน พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่มีผงถ่านให้จำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 16.8 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่านให้ยอดเฉลี่ย 2-3 ยอด สำหรับอาหารสูตร WPM ไม่ส่งเสริมการสร้างยอดจากเมล็ด

Te-chato และคณะ (1995a) รายงานการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้ามังคุดบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าใบอ่อนสีแดงมีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุดรองลงมาเป็นใบอ่อนสีเขียว ก้านใบ และเมล็ดตามลำดับ การใช้ BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเลี้ยงแคลลัสคือ อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,700 ลักซ์ ภายใต้สภาพแวดล้อม

ดังกล่าว พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ 2-3 เท่า หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ การเติม NAA ลงในอาหารเลี้ยงแคลลัสส่งผลให้แคลลัสกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

Te-chato และคณะ (1995b) รายงานว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากใบอ่อนสีแดงสามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม PVP (polyvinyl pyrrolidone, MW 36,000) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการพัฒนาของใบคู่แรกและการยืดยาวของยอด หลังจากย้ายเลี้ยง 2-3 ครั้ง สามารถตัดแยกยอดมังคุดไปชักนำรากโดยการกรีดฐานยอด แล้วจุ่มแช่ในสารละลาย IBA เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ย้ายยอดที่เตรียมได้ไปเลี้ยงในอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร PG (phluroglucinol) 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงแรกวางเลี้ยงในที่มืด 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายไปวางเลี้ยงในสภาพมีแสงพบว่าสามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Te-chato และคณะ (1995c) ศึกษาชนิดของไซโตไคนินโดยเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดรวมที่ได้จากชิ้นส่วนเมล็ดในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ และหรือ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ สามารถชักนำการสร้างใบอ่อนสีแดงได้ดีกว่า BA ส่วนการใช้ BA ร่วมกับ TDZ มีผลใกล้เคียงกับการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว และพบว่าการใช้ NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนสีแดงได้สูงสุด แต่จำนวนแคลลัสต่อชิ้นส่วนน้อยกว่าการใช้ TDZ ขณะที่การใช้ BA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ การเติม NAA ลงในอาหารชักนำแคลลัสมีผลทำให้แคลลัสเป็นสีน้ำตาลและไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ดังนั้นการใช้ BA ร่วมกับ TDZ โดยปราศจาก NAA พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

3. การใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายยีน

อะโกรแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยอยู่ในดินส่วนใหญ่ทำความเสียหายให้กับพืชใบเลี้ยงคู่โดยทำให้เกิดโรคปุ่มปมบริเวณบาดแผลที่เข้าทำลาย เนื้อเยื่อปุ่มปมสามารถเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (Kosuge *et al.*,1982) และในเนื้อเยื่อดังกล่าวมีสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนคือ โอไพน์ ซึ่งสร้างโดยเซลล์พืช เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Hayman *et al.*, 1993) การเกิดโรคปุ่มปมพบว่าเกิดจาก DNA บางส่วนบน Ti plasmid ที่เรียกว่า T-DNA ของอะโกรแบคทีเรียเคลื่อนย้ายเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช (Kosuge *et al.*, 1982) จากการค้นพบ Ti plasmid และได้มีการศึกษากลไกต่างๆ ในการเข้าสู่ต้นพืชพบว่า Ti plasmid มีอยู่ 2 ชนิดตามโอไพน์ที่สร้างขึ้นคือ พลาสมิดชนิดออคโทไพน์มียีนควบคุมการสร้างออคโทไพน์ (*ocs*) และอะโกรไพน์ (*agr*) พลาสมิดชนิดโนพาไลน์ มียีนควบคุมการสร้าง โนพาไลน์ (*nos*) และ

อะโกรซิโนไพน์ (*acs*) จากการวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot hybridization พบว่า Ti plasmid มีส่วนประกอบของ T-DNA ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส เป็นส่วนที่ถูกถ่ายทอดเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชแล้วควบคุมการสร้างโอไพน์ ตามชนิดของ Ti plasmid และอีกส่วนหนึ่งคือ virulent gene (*vir* gene) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช T-DNA ที่ส่งถ่ายไปยังพืชสามารถรวมอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร การเคลื่อนย้ายของ T-DNA กำหนดขอบเขตโดยลำดับเบสที่ซ้ำกัน 2 ข้าง คือ แขนด้านซ้าย (LB) และ แขนด้านขวา (RB) ข้างละประมาณ 25 คู่เบส (Alt *et al.*, 1990) นอกจากนี้กลไกการเคลื่อนย้าย T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียไปยังพืชอาศัยถูกควบคุมโดยกลุ่ม *vir* gene ที่อยู่บน Ti plasmid กลุ่มยีนเหล่านี้ประกอบด้วยยีนที่มีหน้าที่ต่างๆ เช่นยีน *vir* A มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการจดจำสารประกอบฟีนอลคือ อะซิโตไซริงกอน ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคเมื่อเกิดบาดแผล ยีน *vir* D ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง RB และ LB ทำให้เกิดเป็น T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) เคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์พืชโดยเริ่มจากปลายด้าน RB ไปเรื่อยๆ ส่วนปลายด้าน LB ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดความยาวของชิ้น T-DNA เมื่อ T-DNA เข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมพืชจึงมีการแสดงออกของยีนที่อยู่บนส่วนของ T-DNA (Steck *et al.*, 1990) จากผลความสามารถข้างต้นจึงได้พยายามนำส่วนของ T-DNA มาใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืชเช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนทนแล้ง ยีนที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอทธีลีน เป็นต้น พืชก็จะได้รับยีนที่ตัดต่อไว้แทน ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการ

Fillippone และ Lurquin (1989) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ใบเลี้ยงมะเขือยาวเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A281 ที่มีพลาสมิด pGA472 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์แขวนลอยเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่มีค่า OD_{550} 0.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกในอาหารเติมคานามัยซิน 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ใบสามารถปลูกถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือยาวได้ ให้ต้นที่มีความต้านทานต่อคานามัยซิน ในขณะที่การใช้เซลล์แขวนลอยไม่สามารถทำการปลูกถ่ายยีนได้

Moore และคณะ (1992) ทำการปลูกถ่ายยีนในส้ม โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ wild type A281 และ สายเชื้อ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pMON 9793 นำมาเลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนลำต้นความยาว 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS และ MT (Murashige and Tucker, 1969 อ้างโดย Moore *et al.* 1992) โดยหยดเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนรอยตัดของชิ้นส่วน วางเลี้ยงร่วมในแนวตั้งเป็นเวลา 2-3 วัน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมมีโฟซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจสอบกิจกรรมของ GUS (β-glucuronidase) พบว่าสามารถชักนำพืชต้นใหม่ที่ได้จากการปลูกถ่ายยีนจำนวน 2 ต้น

Benjamin และคณะ (1993) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในระย่อม (*Rouvalfia serpentina*) โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ 15434 ที่ผ่านการอินคิวเบทบน

อาหาร AB (White and Nester, 1980) เป็นเวลา 3 วันเลี้ยงร่วมกับตาข้างที่เพิ่งเจริญจากช้อ เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเนื้อเยื่อดังกล่าวสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ต้นที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนแสดงลักษณะทางสัณฐานและทางสรีระแตกต่างจากต้นปกติอย่างชัดเจนเช่น มีดอกสีอ่อนกว่า มีรากลอยและน้ำหนักรากต่อต้นมากกว่าแต่ปริมาณของสารอัลคาลอยด์ไม่มีความแตกต่างกัน

McAfee และคณะ (1993) ศึกษาการชักนำรากของสน *(Pinus banksiana)* larch (*Larix laricina.)* โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ป่าหรือสายเชื้อ R 1000 ที่มีการรวม (conjugate) ด้วยพลาสมิด pRiA4B จำนวน 1 ลูป ป้ายส่วนยอดของต้นกล้าที่ผ่านการตัดรากออกนำไปวางเลี้ยงในเวอร์มิคูไลท์ ภายใต้ความเข้มแสง 120 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจำนวนรากและคุณภาพของรากดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.3 , 3.3 ไมโครโมลาร์ และการไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ

Norelli และคณะ (1994) ทำการปลูกถ่ายยีนในแอปเปิลพันธุ์ Malling 26 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pLDB15 ซึ่งมียีนต้านทานต่อโรคใบไหม้จากเชื้อ *Erwinia amylovora* ที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความหนาแน่น $2x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมอะซีโตไซริงกอน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนใบที่กรีด 3-4 รอยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กำจัดเชื้อส่วนเกินในอาหารเหลวเติมซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และพาโรโมมัยซิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนทางเนื้อเยื่อเคมี (histochemical) และการเพาะเชื้อพบว่าต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีความต้านทานต่อเชื้อ *Erwinia amylovora*

Stephen และคณะ (1994) ทำการปลูกถ่ายยีนในใบโกโก้ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A281ที่มีพลาสมิด pGPTV ที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ระดับความหนาแน่นเชื้อ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับใบอ่อนที่ตัดให้มีขนาด 3x10 มิลลิเมตร ในอาหารที่เติมอะซิโตไซริงกอน 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัดเชื้อส่วนเกินในอาหารเติมคาร์เบนนิซิลิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และวางเลี้ยงคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ใบโกโก้ได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ neomycin phosphotransferase II ในแคลลัส 7 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

Pena และคณะ (1995a) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในส้มเชียวหวาน *(Citrus sinensis)* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 ซึ่งมียีนต้านทานต่อคานามัยซิน และยีน GUS เข้มข้น 4×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยดบนรอยตัด พบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวมีการพัฒนาของยอดบนอาหารคัดเลือกภายใน 12 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของ GUS จากชิ้นส่วนของฐานยอด และตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี Southern hybridization พบว่าสามารถปลูกถ่ายยีนได้ 7.9 เปอร์เซ็นต์

Gama และคณะ (1996) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในมันเทศ (*Ipomoea batatas*) สายพันธุ์ White Star โดยใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ซึ่งมียีนต้านทานต่อคานามัยซิน และยีน GUS เป็นยีนรายงานผล พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและต้นที่สมบูรณ์ ภายในเวลา 7 สัปดาห์

Shackelford และ Chlan (1996) ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 และ LBA 4404 หลังการเลี้ยงร่วม และทดสอบผลของสารปฏิชีวนะดังกล่าวต่อการสร้างแคลลัสของยาสูบ พบว่าซีโฟทาซีมมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการกำจัดสายเชื้อ LBA 4404 และ โมซาแลคแทม สามารถกำจัดสายเชื้อ EHA 101 ได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบผลของสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด ต่อการสร้างแคลลัส พบว่า สารทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัส

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเตรียมใบเพื่อชักนำการสร้างโนดูลาแคลลัส
2. ศึกษาระยะการเจริญเติบโตของโนดูลาแคลลัสที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน
3. ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อความมีชีวิตของโนดูลาแคลลัสและการพัฒนาของยอด
4. ศึกษาความเป็นไปได้ในการปลูกถ่ายยีนให้กับแคลลัสมังคุดด้วยอะโกรแบคทีเรีย
5. นำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์เพื่อทำการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญทางการเกษตรให้กับมังคุด และพืชอื่น ๆ ในสกุลใกล้เคียง

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุพืช

ใช้ใบอ่อนสีแดงอายุ 1-2 สัปดาห์ จากต้นกล้ามังคุดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นแรกเป็นอาหารแข็งสูตร WPM (ภาคผนวกที่ 1) เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นเจลไรท์ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ชั้นที่สองเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

2. เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ใช้เชื้อ 2 ชนิด คือ *Agrobacterium tumefaciens* จำนวน 2 สายเชื้อ คือ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 ส่วนเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* มี 1 สายเชื้อ คือ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 สายเชื้อที่มีพลาสมิด pBI 121 มียีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อคานามัยซินและ GUS เป็นยีนรายงานผล (ภาคผนวกที่ 2) เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร YEB (yeast extract broth) (ภาคผนวกที่ 3) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสายเชื้อที่มีพลาสมิด pTok 233 มียีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน และ GUS เป็นยีนรายงานผล (ภาคผนวกที่ 4) เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร AB (ภาคผนวกที่ 5) เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองมีด้วยกันหลายชนิดคือ สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตร MS, WPM, YEB, และ AB ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองกลุ่มออกซินคือ NAA กลุ่มไซโตไคนินคือ BA, TDZ และสารอื่นๆ คือ PVP น้ำตาลซูโครส วุ้นไฟตาเจลและสารปฏิชีวนะ คานามัยซิน ไฮโกรมัยซิน และซีโฟทาซิม สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS คือ เอ็กกลุ๊ก (X-Gluc) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ไดโซเดียมเอทธิลีนไดอะมีนเตตราอะซิเตท (Na_2 EDTA) ติตรอน X-100 (Titron X-100) โซเดียมลอริลซาโคซิน ซัลเฟต (Sodium lauryl sakosine sulfate) และเบต้าเมอแคปโตเอทธานอล (β-mercaptoethanol)

อุปกรณ์

1. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
4. หม้อนึ่งความดัน ตู้อบไมโครเวฟ ตู้อบฆ่าเชื้อ
5. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง
6. เครื่องเขย่าเลี้ยง เครื่องอัลตราโซนิค
7. เครื่องกรองพร้อมกระดาษมิลลิพอร์
8. เครื่องมือผ่าตัด เช่น ด้ามมีด ใบมีด ปากคีบ
9. เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น จานเพาะเลี้ยง ฟลาสค์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ปิเปต
10. ปิเปต ไมโครปิเปตสำหรับปรับปริมาตรเป็นไมโครลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมอาหาร

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยอาหารเพาะเลี้ยงมังคุดและอะโกรแบคทีเรีย ดังนี้ คือ

1.1. สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมังคุด

1.1.1 สูตรอาหารชักนำยอด ใช้สูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้นไฟตาเจล 0.25 เปอร์เซ็นต์

1.1.2 สูตรชักนำการยืดยาวของยอด ใช้อาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (1/2 MSNBT) หรืออาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (1/2 MSNB) หรืออาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (1/2 MSNT) อาหารทั้ง 3 สูตร เติม PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์

1.1.3 อาหารชักนำแคลลัสหรืออาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส ใช้อาหารพื้นฐานสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ วุ้นไฟตาเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์

1.2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ใช้อาหารแข็งหรือเหลวสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 และ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 มีพลาสมิด pBI 121

สำหรับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok 233 ใช้อาหารแข็งหรือเหลวสูตร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3. อาหารเลี้ยงโนดูลาแคลลัสมังคุดหลังการปลูกถ่ายยีน

1.3.1 อาหารกำจัดเชื้อ

อาหารแข็งสูตร MS เติม BA และ TDZ อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 50-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเหลวสูตรเดียวกัน เติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3.2 อาหารคัดเลือกโนดูลาแคลลัสหลังปลูกถ่ายยีน

ใช้อาหารสูตร 1.1.3 เติมคานามัยซิน 50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3.3 อาหารชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสหลังปลูกถ่ายยีน

ใช้อาหารสูตร 1.1.1 เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารทุกสูตรปรับ pH 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นสารปฏิชีวนะฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน เติมลงในอาหารขณะที่ยังอุ่นอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส

2. การชักนำโนดูลาแคลลัส

ใช้ใบอ่อนสีแดงอายุ 1 - 2 สัปดาห์ จากต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นแรกเป็นอาหารสูตร 1.1.1 ชั้นที่สองเป็นอาหารเหลวสูตร 1.1.2 มาชักนำแคลลัส บนอาหารสูตร 1.1.3 เป็นเวลา 1 เดือน เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เมื่อมีการสร้างแคลลัสจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณซึ่งเป็นอาหารสูตรเดียวกันเพื่อชักนำโนดูลาแคลลัส

3. การตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

ตัดเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนซึ่งต้องการตรวจสอบเป็นชิ้นบางๆ ใส่ในจานหลุม 3-4 ชิ้นต่อหลุม เติมส่วนผสมของ เอ็กกลุ๊ก ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 26 ไมโครลิตร กับ ไลซีสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในจานหลุมๆ ละ 250 ไมโครลิตร ดูดด้วยเครื่องสูญญากาศเป็นเวลา 20 นาที นำชิ้นส่วนในจานหลุมไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงใช้เมทธิลแอลกอฮอล์ล้างคลอโรฟิลล์ออก 3-4 ครั้ง ตรวจสอบสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อที่เกิดจากปฏิกริยาของยีน GUS กับ เอ็กกลุ๊ก

วิธีดำเนินการ

1 การศึกษาการเตรียมใบมังคุด

1.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเหลวสูตร MS `ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง

ใช้กลุ่มตารวมมังคุดซึ่งตัดแยกใบที่พัฒนาเต็มที่ออก นำกลุ่มตารวมมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นไฟตาเจล 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในขวดขนาด 5x10 เซนติเมตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ อาหารที่มีองค์ประกอบครบ (MS) อาหารที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง 1/4 (3/4MS), 1/2 (1/2MS) และ 3/4 (1/4MS) ของสูตรปกติ แต่ละระดับความเข้มข้นของอาหารเติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรที่ใช้เติม 10 มิลลิลิตร สำหรับหน่วยทดลองเปรียบเทียบนั้นไม่เติมอาหารเหลว กลุ่มตารวมทั้งหมดวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึก จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การสร้างใบสีแดง เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของอาหารเหลวโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) แต่ละความเข้มข้นของอาหารทำการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด แต่ละขวดเพาะเลี้ยงกลุ่มตารวม 1 ชิ้น ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range test)

1.2. การศึกษาระยะเวลาการเติมอาหารเหลวต่อการพัฒนาของใบสีแดง

ใช้กลุ่มตารวมมังคุดซึ่งตัดแยกใบที่พัฒนาเต็มที่ออก นำกลุ่มตารวมมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นไฟตาเจล 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในขวดขนาด 5x10 เซนติเมตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลาต่างกัน คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ซึ่งมี NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป นำกลุ่มตารวมทั้งหมดวางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึก จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การสร้างใบสีแดง เปรียบเทียบกันแต่ละระยะเวลาการเติมอาหารเหลว โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละระยะเวลาการเติมอาหารเหลวทำการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด แต่ละขวดเพาะเลี้ยงกลุ่มตารวม 1 ชิ้น ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

1.3. การศึกษาชนิดของไซโตไคนินต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด

ใช้กลุ่มตารวมมังคุดซึ่งตัดแยกใบที่พัฒนาเต็มที่ออก นำกลุ่มตารวมมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3

เปอร์เซ็นต์ และวุ้นไฟตาเจล 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในขวดขนาด 5x10 เซนติเมตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ซึ่งมี NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ TDZ หรือ BA กับ TDZ ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางเลี้ยงกลุ่มตารวมทั้งหมดภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย พื้นที่ใบ และเปอร์เซ็นต์การสร้างใบสีแดง เปรียบเทียบกันระหว่างอาหารที่มีไซโตไคนินต่างกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD อาหารแต่ละสูตรทำการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 6 ขวด แต่ละขวดใช้กลุ่มตารวม 1 ชิ้น ตรวจสอบความแตกต่าง โดยใช้ DMRT

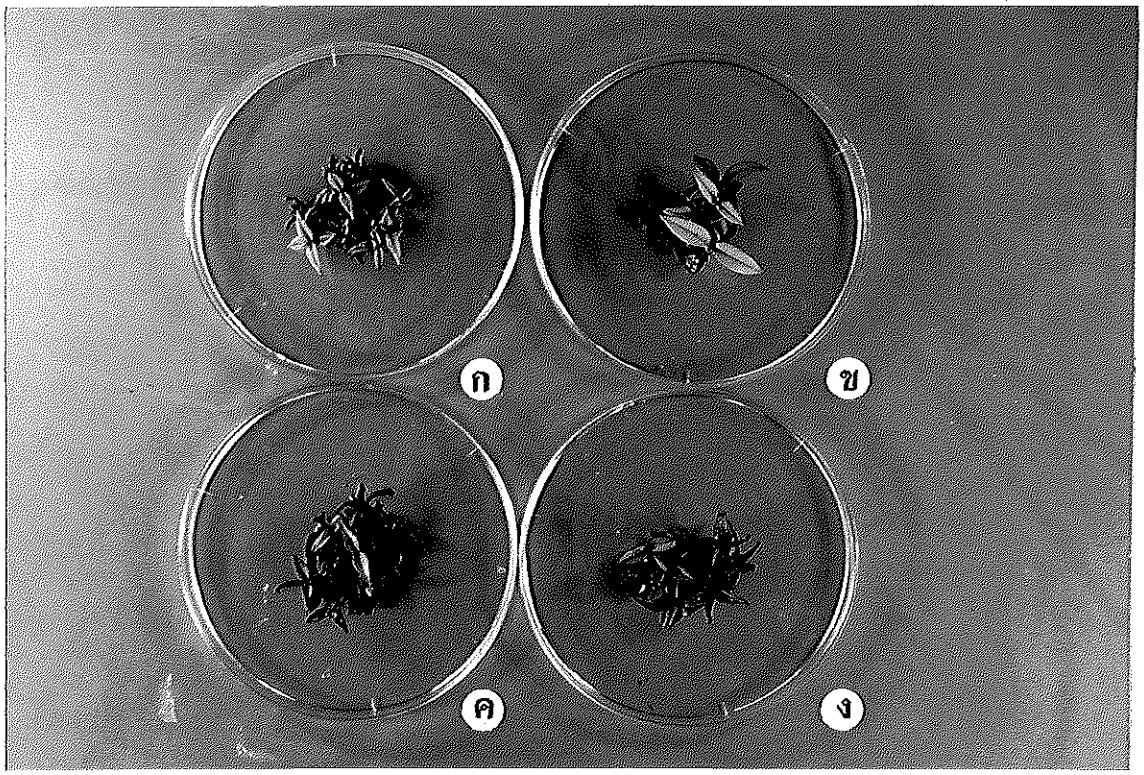
2. การชักนำแคลลัส

2.1. การศึกษาผลของสูตรอาหารที่เตรียมใบอ่อนสีแดงต่อการสร้างแคลลัส

ใช้ใบอ่อนสีแดงอายุ 1-2 สัปดาห์ จากต้นกล้าที่เตรียมเลี้ยงบนอาหาร 4 สูตร คือ สูตร WPM, WPM + 1/2MSNB, WPM + 1/2MSNT, WPM + 1/2MSNBT (รูปที่ 1) โดยวางเลี้ยงให้ด้านหลังใบสัมผัสกับอาหารในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เพื่อชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ตำแหน่งการสร้าง ขนาด ชนิด และสีของแคลลัส เปรียบเทียบกันแต่ละสูตรอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสูตรอาหารทำการทดลอง 5 ซ้ำ (แต่ละจานเพาะเลี้ยงคิดเป็น 1 ซ้ำ) ใช้ใบซ้ำละ 50 ใบ ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

2.2. การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดงมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส ซึ่งบรรจุในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักของแคลลัสทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัสในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการวัด ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ (แต่ละจานเพาะเลี้ยงคิดเป็น 1 ซ้ำ) แต่ละจานเพาะเลี้ยงใช้แคลลัส 10 ชิ้น



รูปที่ 1 ลักษณะของใบจากต้นกล้ามังคุดที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ

(ก) WPM (ข) WPM + 1/2MSNB

(ค) WPM + 1/2MSNT (ง) WPM + 1/2MSNBT

3. การศึกษาวิธีการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

3.1. การศึกษาผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส

ใช้แคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดงมังคุด หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1.3 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาวางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมซึ่งเป็นอาหารสูตรเดียวกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จนโนดูลาแคลลัสพัฒนาให้เห็น จากนั้นย้ายโนดูลาแคลลัสเลี้ยงในอาหารใหม่สูตร 1.1.1 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ อาหารทั้ง 2 สูตร เติมซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิม โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละความเข้มข้นทำการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ขวด ขวดละ 5 แคลลัส ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

3.2.การศึกษาผลของคานามัยซินต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

ใช้โนดูลาแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1.3. มาจุ่มแช่กับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโนดูลาแคลลัสมาเลี้ยงร่วมบนอาหารสูตร 1.1.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายโนดูลาแคลลัสไปยังอาหารแข็งสูตร 1.3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมอีกครั้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นย้ายโนดูลาแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1.3 เติมคานามัยซินระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อคานามัยซิน และทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1.1 เติมคานามัยซินระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น เพื่อชักนำยอด ตรวจสอบความสามารถในการสร้างยอดในแต่ละความเข้มข้นของคานามัยซินเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละระดับความเข้มข้นของคานามัยซินทำการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 4 แคลลัส ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

3.3. การศึกษาชนิดของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและเวลาการเลี้ยงร่วมต่อการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ อะโกรแบคทีเรีย 3 สายเชื้อ สายเชื้อที่ 1 LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 สายเชื้อที่ 2 คือ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และสายเชื้อที่ 3 คือ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 โดยสายเชื้อที่ 1 และ 2 เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายเชื้อที่ 3 เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปัจจัยที่ 2 คือเวลาในการเลี้ยงร่วม 3 เวลา คือ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้โนดูลาแคลลัสมาจุ่มแช่กับเชื้ออะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อในอาหารเหลวสูตร YEB หรือสูตร AB

ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งบรรจุในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง สำหรับหน่วยทดลองเปรียบเทียบใช้แคลลัสจุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน (YEB หรือ AB) แต่ไม่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ย้ายโนดูลาแคลลัสมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1.3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมอีกครั้งและเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกิน จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกของแต่ละสายเชื้อ สูตร 1.3.2 สุ่มแคลลัสบางส่วนนำไปตรวจสอบกิจกรรมของ GUS (ตรวจสอบทางเนื้อเยื่อเคมี) ย้ายแคลลัสที่เหลือไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมหลังจากวางเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 ครั้ง จากนั้นย้ายไปยังอาหารสูตร 1.3.3 เพื่อชักนำยอดและประเมินผลความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและระยะเวลาในการเลี้ยงร่วม เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ในแฟคทอเรียล แต่ละสายเชื้อและเวลาในการเลี้ยงร่วมทำการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 แคลลัส ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

3.4. การศึกษาความหนาแน่นของเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ซึ่งผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปรับความหนาแน่นของเชื้อ 3 ระดับคือ $3.75x10^{7}$, $6.1x10^{8}$ และ $9.8x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำโนดูลาแคลลัสมาจุ่มแช่เชื้อเป็นเวลา 10 นาที วางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1.3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมอีกครั้งและเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงตามลำดับเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกิน แล้วย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.3.3 เพื่อคัดเลือกแคลลัสที่มีการปลูกถ่ายยีน วางเลี้ยงภายใต้สภาพความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อคานามัยซิน ตรวจสอบเนื้อเยื่อเคมีและตรวจสอบความสามารถในการสร้างยอดในแต่ละความหนาแน่นของเชื้อเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละความหนาแน่นของเชื้อทำการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 แคลลัส ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

3.5. การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิค

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความหนาแน่นเชื้อเป็น $9.8x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับโนดูลาแคลลัส กระตุ้นให้มีการปลูกถ่ายยีนโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิคเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 วินาที ย้ายโนดูลาแคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1.3.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมอีกครั้งและเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นย้ายโนดูลาแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 1.3.3 เพื่อคัดเลือกแคลลัสที่มีการปลูกถ่ายยีน นำแคลลัสบางส่วนไปตรวจสอบทางเนื้อเยื่อเคมี วางเลี้ยงแคลลัสภายใต้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ เวลาการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศา

เซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกผลการต้านทานต่อคานามัยซิน และเปอร์เซ็นต์สร้างยอด เพื่อประเมินความสามารถในการปลูกถ่ายยีนโดยใช้อัลตราโซนิคที่ระยะเวลาต่างๆ กันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD แต่ละระยะเวลาทำการทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 แคลลัส ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ DMRT

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาการเตรียมใบมังคุด

1.1. การศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด

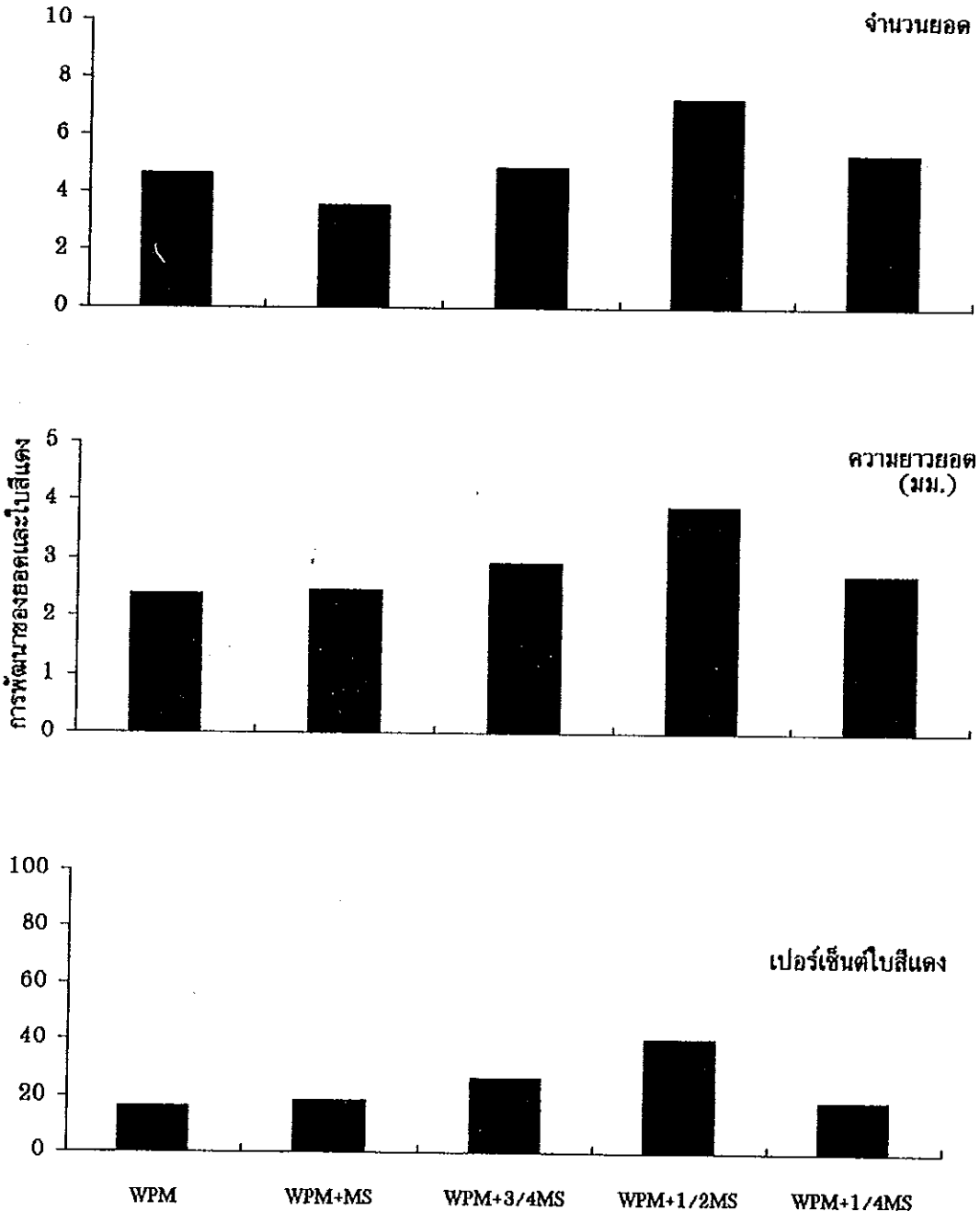
ผลจากการเติมอาหารเหลวสูตร MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับความเข้มข้นต่างกันลงบนอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งวางเลี้ยงกลุ่มตายอดมังคุดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วทำการเลี้ยงต่อเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารเหลวสูตร 1/2 MS ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.2 ยอดต่อกลุ่มตารวม รองลงมาคือการเติมอาหารเหลวสูตร 1/4 MS ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.3 ยอดต่อกลุ่มตารวม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเติมอาหารเหลวสูตร 3/4 MS อาหารสูตร WPM ที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว และการเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่มีองค์ประกอบครบ ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.8, 4.6 และ 3.5 ยอดตามลำดับ และจากการวัดความยาวยอดเฉลี่ย พบว่า อาหารเหลวสูตร 1/2 MS ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.88 มิลลิเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเติมอาหารเหลวระดับความเข้มข้นอื่นๆ ในทำนองเดียวกับการสร้างใบสีแดง พบว่าอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ให้เปอร์เซ็นต์ใบสีแดงสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเติมอาหารเหลวระดับความเข้มข้นอื่น ๆ และหน่วยทดลองที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว (ตารางที่ 1 รูปที่ 2)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอด และใบสีแดงมังคุด

สูตรอาหาร	จำนวนยอดฉลี่ยต่อกลุ่มตารวม	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	เปอร์เซ็นต์ใบสีแดง
WPM	4.6 b	2.36 b	16 b
WPM + MSNB	3.5 b	2.43 b	18 b
WPM + 3/4MSNB	4.8 b	2.92 b	26 b
WPM + 1/2 MSNB	7.2 a	3.88 a	40 a
WPM + 1/4 MSNB	5.3 ab	2.7 b	18 b
F-test	**	**	**
C.V. (%)	16.84	11.28	27.92

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)
ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง

1.2. การศึกษาระยะเวลาเติมอาหารเหลวต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด

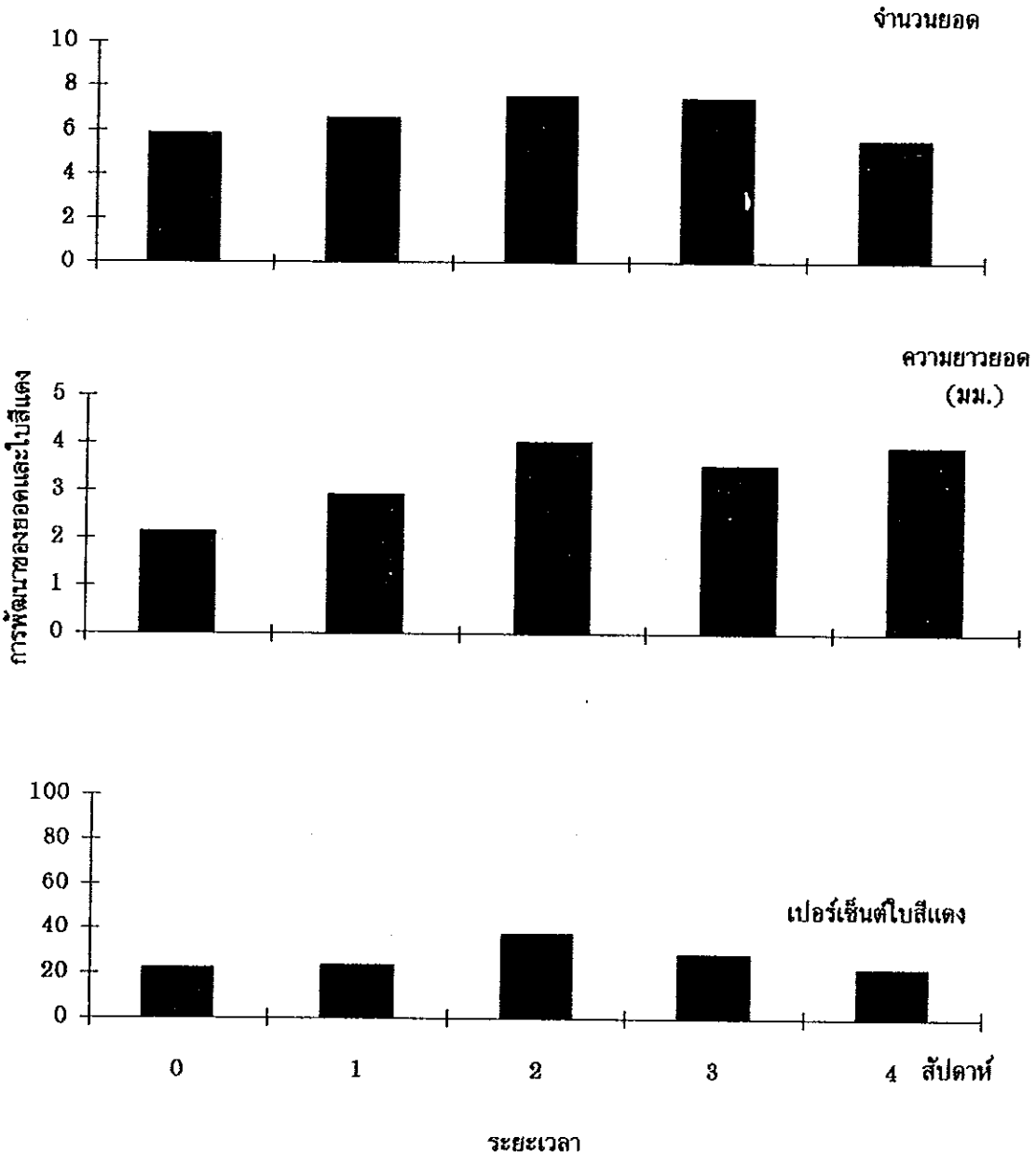
ผลการเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MSNB ลงบนอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อเลี้ยงกลุ่มตายอดมังคุด พบว่า เวลา 2 สัปดาห์ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.5 ยอดต่อกลุ่มตารวม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการเติมอาหารเหลวเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 7.4 ยอด แต่พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเติมอาหารเหลวเป็นเวลา 1, 4 สัปดาห์ และกลุ่มตารวมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ย 6.5, 5.5 และ 5.8 ยอดตามลำดับ สำหรับการเติมอาหารเหลวในสัปดาห์ที่ 2 ส่งเสริมการยืดยาวของยอดเฉลี่ยสูงสุด 4 มิลลิเมตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการเติมอาหารเหลวที่เวลาอื่นๆ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงโดยไม่เติมอาหารเหลว ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ยต่ำสุดเพียง 2.1 มิลลิเมตร และพบว่าการเติมอาหารเหลวในสัปดาห์ที่ 2 ให้เปอร์เซ็นต์ใบสีแดงสูงสุด 37 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเติมอาหารเหลวที่เวลาต่างๆ และกลุ่มตารวมที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว (ตารางที่ 2 รูปที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของระยะเวลาการเติมอาหารเหลว 1/2 MSNB ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด

ระยะเวลา (สัปดาห์)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มตารวม	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	เปอร์เซ็นต์ใบสีแดง
0	5.8 b	2.1 b	22 b
1	6.5 b	2.9 a	23 b
2	7.5 a	4.0 a	37 a
3	7.4 a	3.5 a	28 b
4	5.5 b	3.9 a	22 b
F-test	**	**	**
C.V. (%)	8.63	14.40	15.21

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



รูปที่ 3 ผลของระยะเวลาการเติมอาหารเหลวสูตร MS ต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง

1.3 การศึกษาชนิดของไซโตไคนินต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด

ผลจากการเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MSNB, 1/2 MSNT และ 1/2 MSNBT เปรียบเทียบการพัฒนาของกลุ่มตารวมกับอาหารแข็งสูตร WPM ที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว พบว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MSNBT ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.3 ยอดซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MSNT ที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 5.9 ยอด แต่แตกต่างทางสถิติกับการเลี้ยงในสูตรอาหารอื่นคือสูตร 1/2 MSNB และอาหารสูตร WPM ที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MSNB ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.9 มิลลิเมตร แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับหน่วยการทดลองอื่นๆ ในทำนองเดียวกับพื้นที่ใบ การเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MSNB ให้พื้นที่ใบสูงสุด 22.7 ตารางมิลลิเมตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการเติมอาหารสูตร 1/2 MSNT และ 1/2 MSNBT ให้พื้นที่ใบที่มีขนาดเท่ากัน 17.3 ตารางมิลลิเมตร แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการใช้อาหารสูตร WPM เพียงอย่างเดียว ซึ่งให้พื้นที่ใบต่ำสุด 12 ตารางมิลลิเมตร ส่วนการสร้างใบสีแดง พบว่าทุกหน่วยการทดลองให้เปอร์เซ็นต์ใบสีแดงแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง การเติมอาหารสูตร 1/2 MSNBT ให้เปอร์เซ็นต์ใบสีแดงสูงสุด 59.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้อาหารสูตร 1/2 MSNT และสูตร 1/2 MSNB ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ใบสีแดง 50 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่ไม่มีการเติมอาหารเหลวให้เปอร์เซ็นต์ต่ำสุด 21.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 รูปที่ 4) และเมื่อนำใบจากกลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงบนอาหารทั้ง 4 สูตร มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่าใบจากกลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่ไม่มีการเติมอาหารเหลว มีผิวใบเรียบ เส้นกลางใบมีขนาดใหญ่ เส้นใบย่อยมองเห็นได้ไม่ชัดเจน สีของใบให้สีแดงอ่อนทั่วทั้งใบ (รูปที่ 5 ก) สำหรับใบที่พัฒนาจากการเติมอาหารเหลว ให้ใบที่มีลักษณะอวบน้ำ เส้นกลางใบมีขนาดใหญ่และมองเห็นได้ชัดเจน ใบที่ได้จากอาหารสูตร 1/2 MSNB มีแผ่นใบเป็นสีเขียวบริเวณขอบใบเป็นสีแดง (รูปที่ 5 ข) สำหรับใบที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MSNT ใบมีสีแดงเข้มทั่วทั้งแผ่นใบ เนื่องจากมีรงควัตถุชนิดแอนโธไซยานินกระจายทั่วแผ่นใบ และบริเวณขอบเป็นรอยหยัก (รูปที่ 5 ค) ส่วนใบที่ได้จากอาหารสูตร 1/2 MSNBT ให้ปลายใบและขอบใบเป็นสีแดง ส่วนโคนใบเป็นสีเขียว ใบสีแดงที่ได้จากอาหารสูตรนี้ เหมาะสมใช้ในการชักนำแคลลัส (รูปที่ 5 ง)

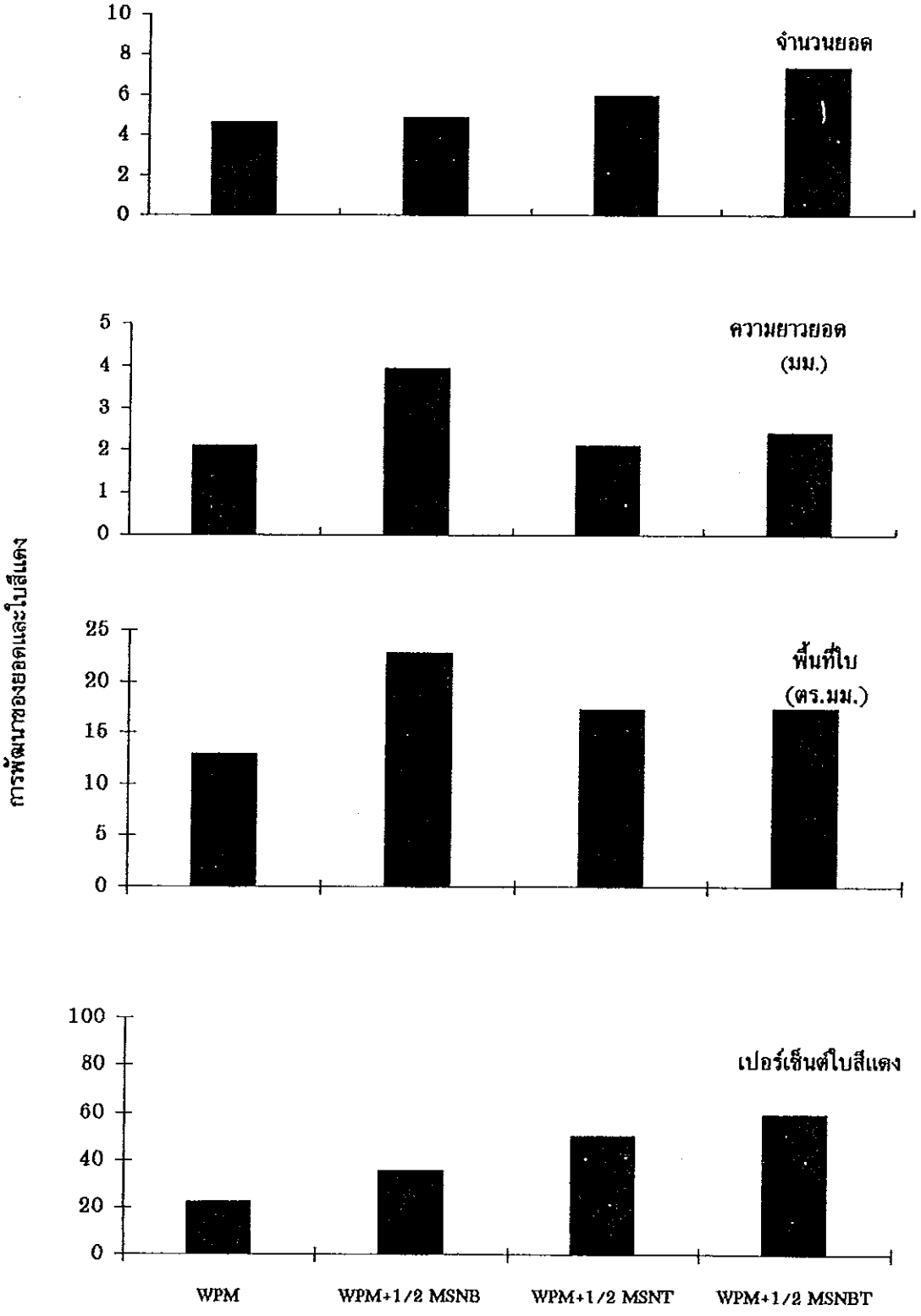
ตารางที่ 3 ผลของชนิดไซโตไคนินต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดงมังคุด

สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มตารวม	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)	พื้นที่ใบ (ตร.มม.)	เปอร์เซ็นต์ใบสีแดง
WPM	4.6 b	2.1 b	12.0 b (2.4/5.0)	21.8 d
WPM+1/2MSNB	4.8 b	3.9 a	22.7 a (3.2/7.1)	35.0 c
WPM+1/2MSNT	5.9 ab	2.1 b	17.3 ab (2.3/7.5)	50.0 b
WPM+1/2MSNBT	7.3 a	2.4 b	17.3 ab (2.5/6.9)	59.4 a
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	11.52	9.99	14.53	6.95

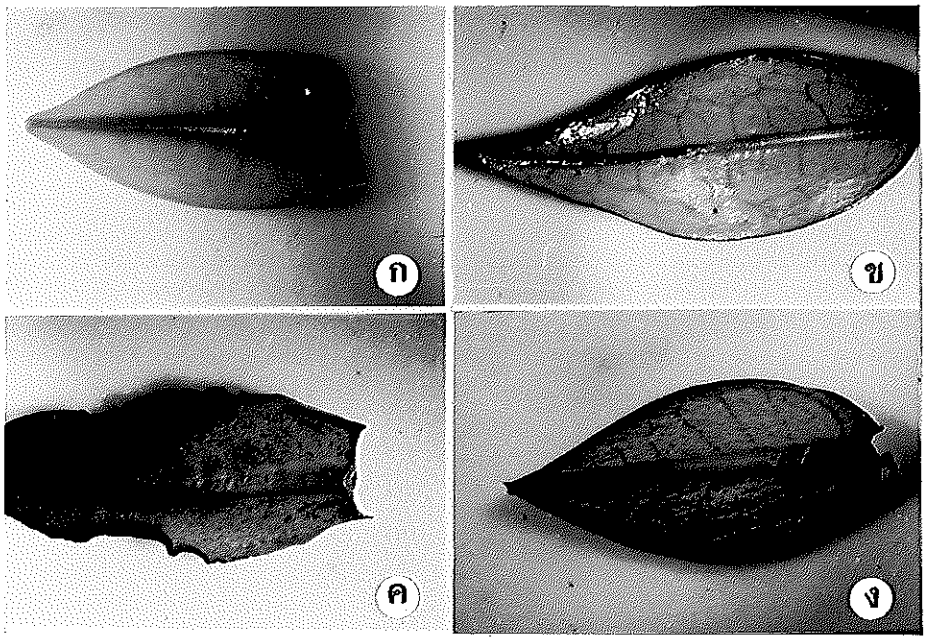
ตัวเลขในวงเล็บเป็นค่าความกว้าง/ความยาวของใบ

** แตกต่างอย่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



รูปที่ 4 ผลของชนิดไซโตไคนินต่อการพัฒนาของยอดและใบสีแดง



รูปที่ 5 ลักษณะใบจากกลุ่มตารวมวางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM (ก) และ WPM เติมอาหารเหลว 1/2 MS มี BA (ข) TDZ (ค) และ BA ร่วมกับ TDZ (ง) (X 9.6)

การศึกษาที่ 2 การชักนำแคลลัส

2.1 การศึกษาผลของสูตรอาหารที่เตรียมใบอ่อนสีแดงต่อการสร้างแคลลัส

จากการชักนำการสร้างแคลลัสของใบมังคุดจากกลุ่มตารวมที่เตรียมเลี้ยงบนอาหาร 4 สูตร พบว่าใบจากกลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น สูตร WPM + 1/2 MSNBT ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด 97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือใบที่ได้จากอาหารสูตร WPM + 1/2 MSNB และ WPM + 1/2 MSNT ให้แคลลัส 89.6 และ 83.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนใบที่ได้จากการเตรียมเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เพียงชั้นเดียวสร้างแคลลัสได้น้อยที่สุด 81.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตำแหน่งการสร้างแคลลัสของใบพบว่าทุกหน่วยการทดลองสามารถสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดบริเวณโคนใบ (proximal end) (ตารางที่ 4 รูปที่ 6) และพบว่าตำแหน่งการสร้างแคลลัสของใบมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง โดยที่แคลลัสเกิดทั้งบริเวณโคนใบและเส้นกลางใบ บริเวณโคนใบและปลายใบ บริเวณโคนใบ เส้นกลางใบและปลายใบ หรือ บริเวณโคนใบ เส้นกลางใบ ปลายใบ และแผ่นใบ (รูปที่ 7) แต่ใบที่ได้จากอาหารสูตร WPM + 1/2 MSNB ให้แคลลัสบริเวณแผ่นใบ (laminae) ขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาคือแคลลัสบริเวณเส้นกลางใบ (midrib) โคนใบและปลายใบ (distal end) ส่วนใบที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เพียงอย่างเดียวไม่มีการสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบ (ตารางที่ 5) แคลลัสบริเวณโคนใบ เส้นกลางใบ และปลายใบ มีลักษณะสีเขียวหรือเหลือง โครงสร้างแบบเกาะตัวกันแน่น (compact callus) สามารถพัฒนาเป็นโนดูลาแคลลัส และชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้ ส่วนแคลลัสบริเวณแผ่นใบและบริเวณโคนใบเพียงบางส่วนที่พัฒนาจากใบที่เตรียมเลี้ยงในอาหารสูตร WPM มีลักษณะสีเหลือง น้ำตาลหรือสีเทา มีโครงสร้างแบบเกาะตัวอย่างหลวมๆ (friable callus) ไม่สามารถพัฒนาเป็นโนดูลาแคลลัส และไม่สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 6 รูปที่ 8)

ตารางที่ 4 ผลของสูตรอาหารที่ใช้เตรียมเลี้ยงกลุ่มยอดรวมต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสจากใบ

ตำแหน่งการสร้างแคลลัส	WPM	WPM + 1/2 MSNB	WPM + 1/2 MSNT	WPM + 1/2 MSNBT	F-test	C.V.(%)
1.โคนใบ	75	57.2	38.5	42.5		
2.เส้นกลางใบ	4	3.6	26	14.5		
3.ปลายใบ	0	0.8	0	0.5		
4.แผ่นใบ	0	0.4	0.5	0		
1+2	0	16.4	15	32		
1+3	1	6	1	3		
1+4	1.5	3.2	1.5	1		
1+2+3	0	1.6	1	3.5		
1+2+3+4	0	0.4	0	0		
รวม	81.5b	89.6ab	83.5b	97a	**	7.22

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT

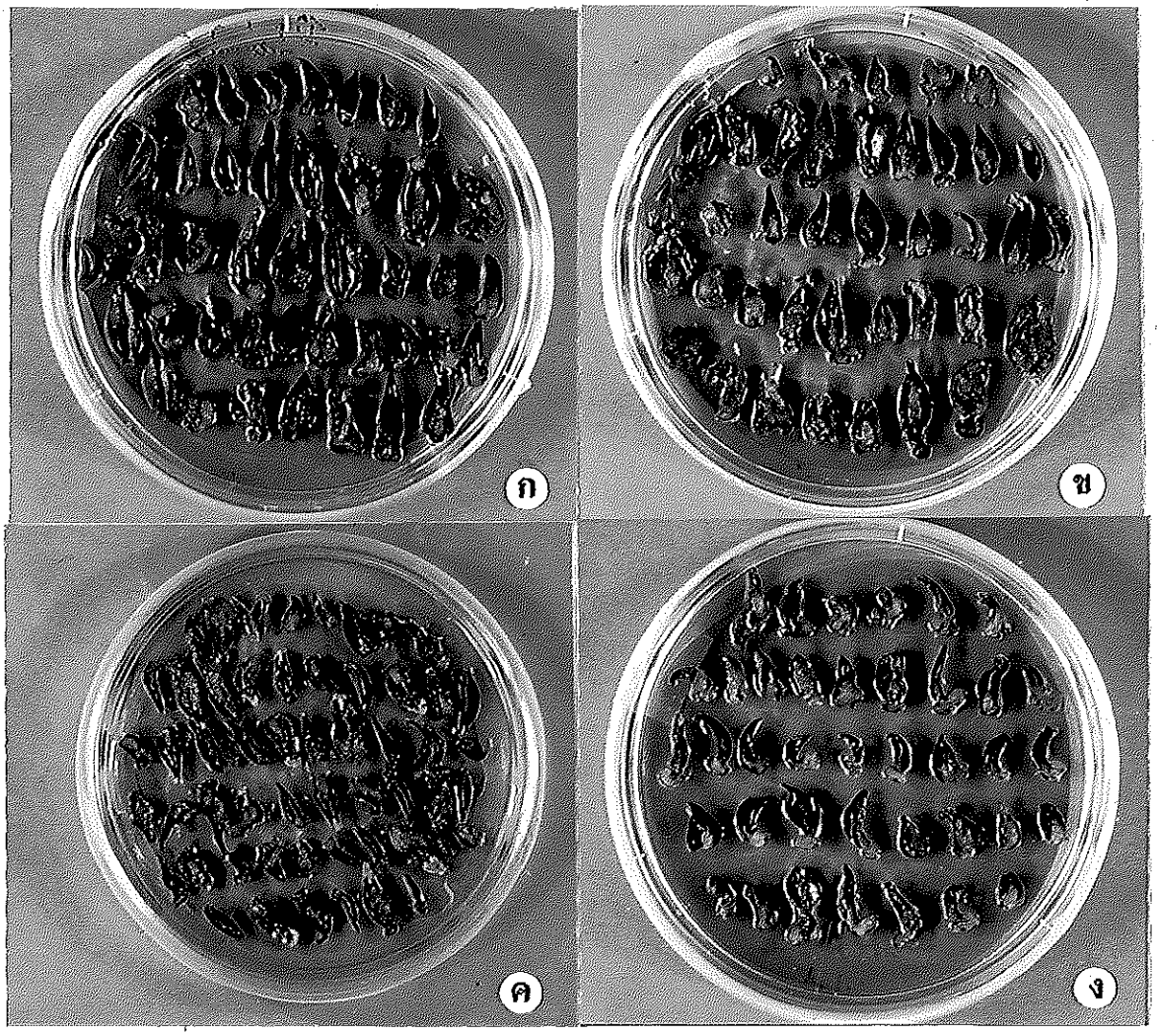
ตารางที่ 5 ผลของสูตรอาหารที่ใช้เตรียมกลุ่มยอดรวมต่อขนาดของแคลลัสที่พัฒนาจากใบ

ตำแหน่งใบ	ขนาดของแคลลัส (มม.)			
	WPM	WPM + 1/2 MSNB	WPM + 1/2 MSNT	WPM + 1/2 MSNBT
โคนใบ	2.9 b (1-6)	2.9 b (1-7)	2.6 a (2-6)	4.1 a (2-8)
เส้นกลางใบ	4.56 a (2-6)	3.4 b (1-9)	3.7 a (2-7)	4.6 a (2-11)
ปลายใบ	1.3 c (2-5)	2.2 b (1-5)	2.2 c (2-3)	1.74 b (1-4)
แผ่นใบ	0 d	5.9 a (2-13)	2.3 c (2-3)	1.0 b (2-3)
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	28.97	21.06	18.63	34.50

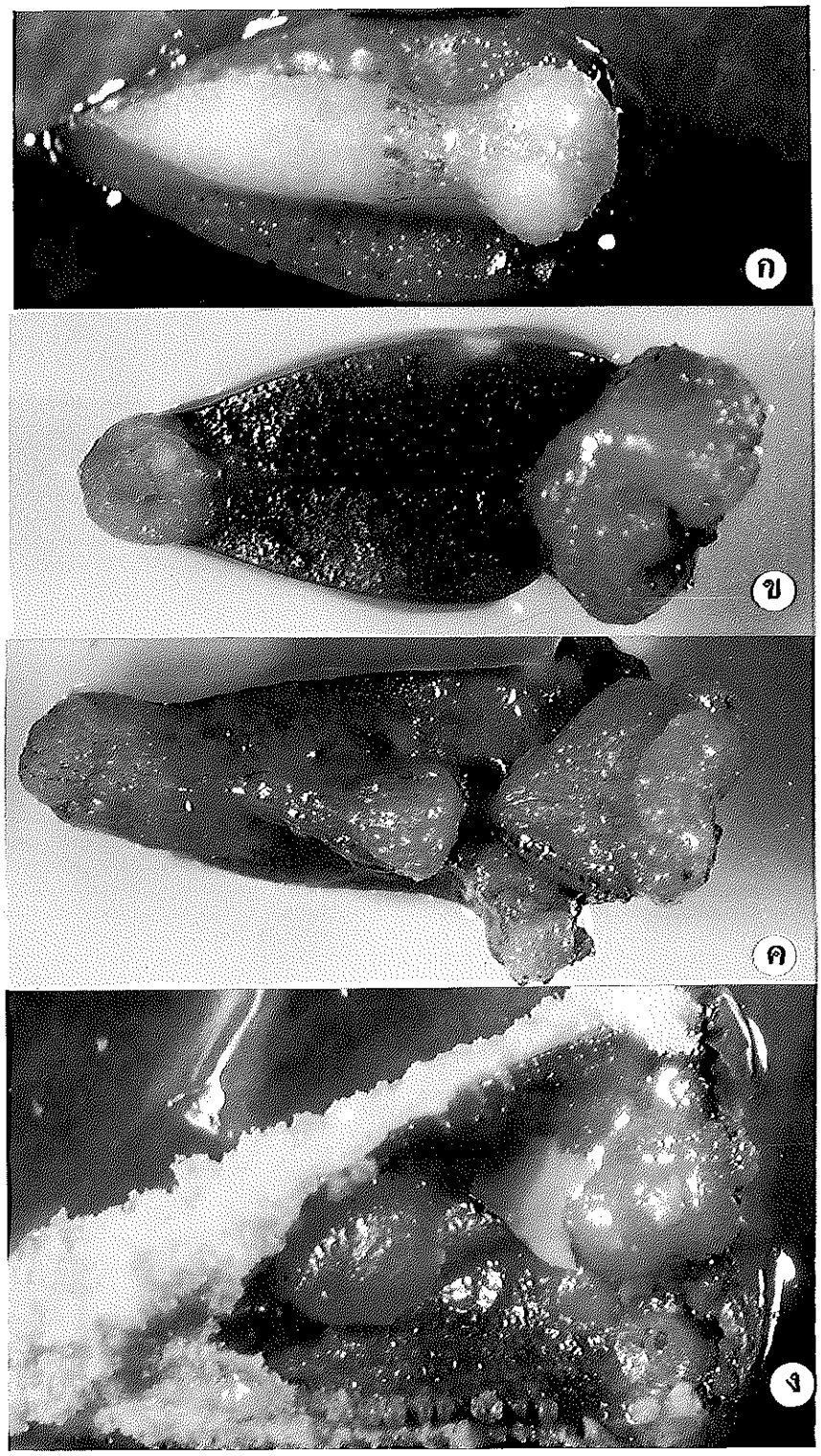
ตัวเลขในวงเล็บเป็นค่าต่ำสุดและสูงสุด

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันกำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



รูปที่ 6 แคลลัสของใบจากกลุ่มยอดรวมที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร
ต่างๆ ก่อนนำมาชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MSBT
(ก) WPM (ข) WPM + 1/2 MSNB
(ค) WPM + 1/2 MSNT (ง) WPM + 1/2 MSNBT



รูปที่ 7 รูปแบบการสร้างแคลลัสจากการวางเลี้ยงใบมังคุดในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (X 14)

(ก) แคลลัสบริเวณโคนใบและเส้นกลางใบ

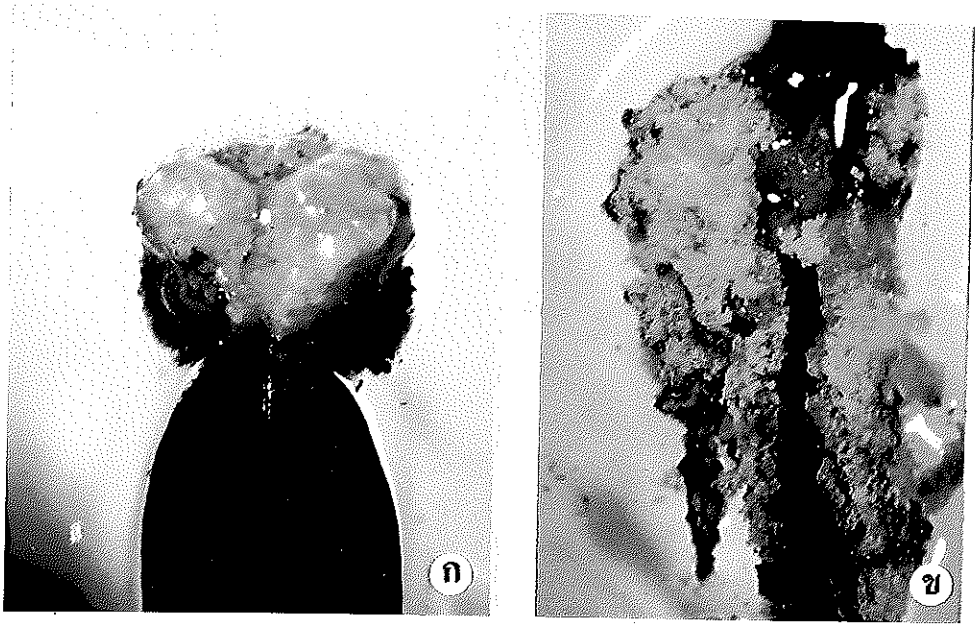
(ข) แคลลัสบริเวณโคนใบและปลายใบ

(ค) แคลลัสบริเวณโคนใบ เส้นกลางใบและปลายใบ

(ง) แคลลัสบริเวณโคนใบ เส้นกลางใบ ปลายใบและแผ่นใบ

ตารางที่ 6 ผลของสูตรอาหารที่เตรียมเลี้ยงกลุ่มยอดรวมต่อชนิดและสีของแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนต่างๆ ของใบ

สูตรอาหาร	ตำแหน่งใบ	ชนิดของแคลลัส	สีของแคลลัส
WPM	โคนใบ	เกาะตัวกันแน่น, เกาะตัวกันหลวมๆ	เขียว,เหลือง, เทา
	เส้นกลางใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว
	ปลายใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว
	แผ่นใบ	-	-
WPM+1/2MSNB	โคนใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	เส้นกลางใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	ปลายใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	แผ่นใบ	เกาะตัวกันหลวมๆ	เหลือง,น้ำตาล
WPM+1/2MSNT	โคนใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	เส้นกลางใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	ปลายใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	แผ่นใบ	เกาะตัวกันหลวมๆ	เหลือง,น้ำตาล
WPM+1/2MSNBT	โคนใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	เส้นกลางใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	ปลายใบ	เกาะตัวกันแน่น	เขียว,เหลือง
	แผ่นใบ	เกาะตัวกันหลวมๆ	เหลือง,น้ำตาล



รูปที่ 8 แคลลัสที่มีโครงสร้างแบบเกาะตัวอย่างหลวม ๆ
(ก) บริเวณโคนใบ (ข) บริเวณแผ่นใบ

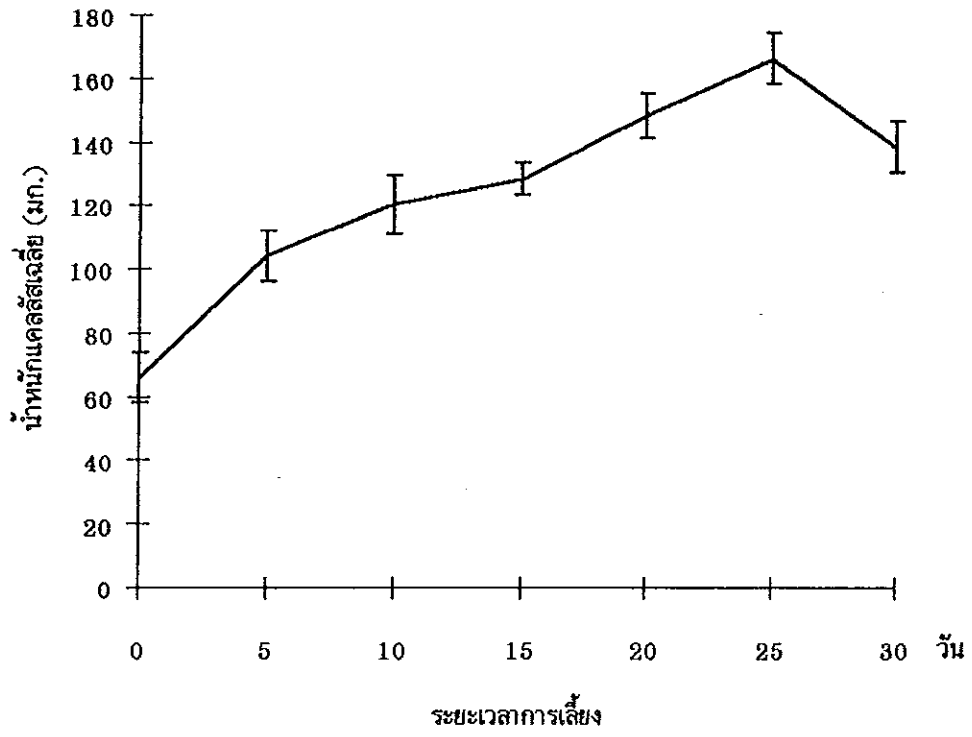
2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ใช้ในการปลูกถ่ายยีน

นำแคลลัสที่ชักนำจากใบมังคุดมาวางเลี้ยงบนอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัสสูตร 1.1.3 หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สามารถแบ่งระยะการเจริญเติบโตของแคลลัสออกเป็น 3 ช่วง คือช่วงแรก น้ำหนักเฉลี่ยค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์มีการดูดน้ำและธาตุอาหารเพื่อใช้ในกิจกรรมการแบ่งเซลล์ ระยะดังกล่าวอยู่ในช่วง 5- 10 วัน ช่วงที่สองหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15-25 วัน เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสเพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มสูงสุดเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน แต่พบว่าเวลาวางเลี้ยง 25 วัน ทำให้บริเวณรอบ ๆ ก้อนของแคลลัสบางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และช่วงที่สามหลังจากวางเลี้ยงที่ 25- 30 วัน เป็นระยะที่เซลล์หยุดการแบ่งตัว เพราะมีธาตุอาหารจำกัดและอาจมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีทำให้น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสเริ่มลดลง และลักษณะสีของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นจึงควรมีการย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารใหม่สูตรเดิมก่อนวันที่ 25 วัน หลังการวางเลี้ยง เพื่อให้ได้แคลลัสที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน (ตารางที่ 7 รูปที่ 9)

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลา 30 วัน

ระยะเวลาวางเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (มก.)
0	66 ± 8
5	104 ± 8
10	120 ± 9
15	128 ± 5
20	148 ± 7
25	166 ± 8
30	138 ± 8

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 9 รูปแบบการเจริญเติบโตของแคลลัสมังคุดในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

การศึกษาที่ 3 การศึกษาวิธีการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

3.1 การศึกษาผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส

ผลจากการเติมซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัส สูตร 1.1.3 และเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 97.5 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หลังจากย้ายโนดูลาแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดและเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า อาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซิมและเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โนดูลาแคลลัสให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุดเท่ากัน คือ 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือความเข้มข้น 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเท่ากัน 90 เปอร์เซ็นต์ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 82.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้น 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 80 และ 72.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับผลของซีโฟทาซิมต่อการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัส พบว่าความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ในการสร้างยอดสูงสุดเท่ากันคือ 35 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด 32.5 เปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและชุดเปรียบเทียบที่ไม่เติมซีโฟทาซิม ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนซีโฟทาซิมความเข้มข้น 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด 7.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8 รูปที่ 10)

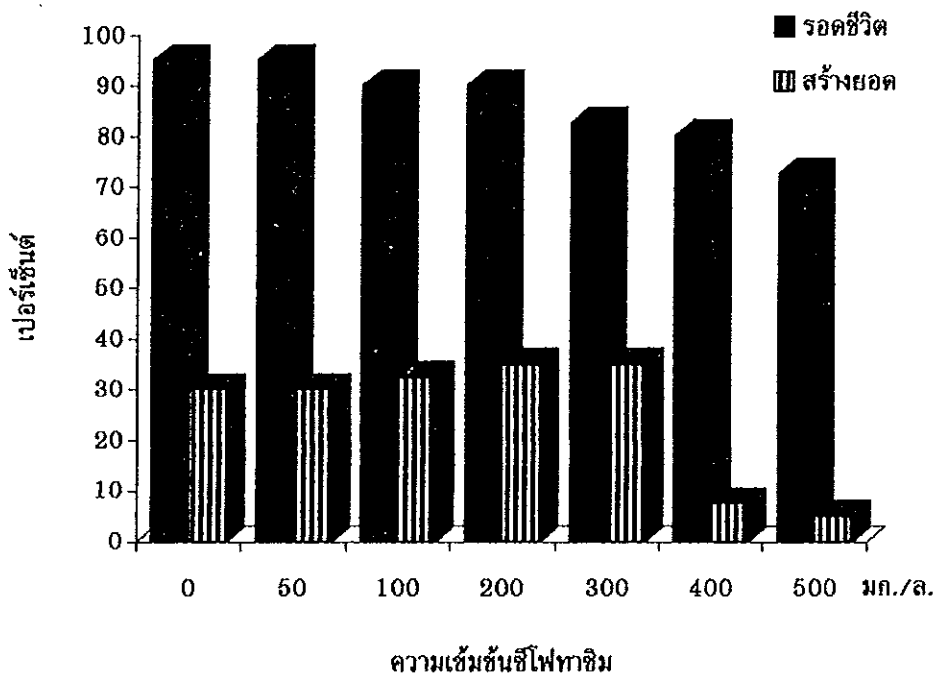
ตารางที่ 8 ผลของซีโฟทาซิมต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สร้างยอดจากโนดูลา แคลลัส

ความเข้มข้นของซีโฟทาซิม (มก./ล)	สูตร MS (3 สัปดาห์)	สูตร WPM (6 สัปดาห์)	
	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์สร้างยอด
0	100	95.0 a	30.0 a
50	100	95.0 a	30.0 a
100	100	90.0 ab	32.5 a
200	100	90.0 ab	35.0 a
300	100	82.5 abc	35.0 a
400	100	80.0 bc	7.5 b
500	97.5	72.5 c	5.0 b
F-test	ns	**	**
C.V. (%)	1.90	6.91	33.24

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



รูปที่ 10 ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์สร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส

3.2 การศึกษาผลของคานามัยซินต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

ผลจากการใช้คานามัยซินความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterim tumefaciens* พบว่าแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบางส่วนเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 โนดูลาแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตหลังปลูกถ่ายยีนสูงสุด 87.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 81.25 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติกับโนดูลาแคลลัสที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อซึ่งให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 50 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนคานามัยซินความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติกับโนดูลาแคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อมีแนวโน้มว่าให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตหลังปลูกถ่ายยีนสูงกว่า คือ 43.75 และ 18.75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แคลลัสไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 37.5 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 9) หลังจากนั้นย้ายโนดูลาแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารชักนำยอด (ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2) และวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าโนดูลาแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุด 12.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 6.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเท่ากันกับโนดูลาแคลลัสที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ การเพิ่มความเข้มข้นของคานามัยซินเป็น 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้โนดูลาแคลลัสที่ไม่เลี้ยงร่วมตายทั้งหมด เมื่อย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 พบว่าแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงร่วมเท่านั้นที่มีชีวิตรอดในอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสมีเพียง 6.25 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสร้างยอดได้จำนวน 1 ยอด ส่วนโนดูลาแคลลัสที่ไม่เลี้ยงร่วมไม่มีชีวิตรอดในอาหารเติมคานามัยซินทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 9 รูปที่ 11) ดังนั้นการเติมคานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกหลังการปลูกถ่ายยีน และจากการสุ่มโนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตหลังปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ด้วยวิธีเนื้อเยื่อเคมี พบว่าไม่ปรากฏให้เห็นกิจกรรมของ GUS

3.3 การศึกษาชนิดของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและเวลาการเลี้ยงร่วมต่อการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายเชื้อ เลี้ยงร่วมกับโนดูลาแคลลัสเป็นระยะเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง หลังวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าการใช้สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตในอาหารเติมคานามัยซินเข้มข้นสูงสุด 57.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้สายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต

ตารางที่ 9 ผลของคานามัยซินต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สร้างยอดของโนดูลาแคลลัส

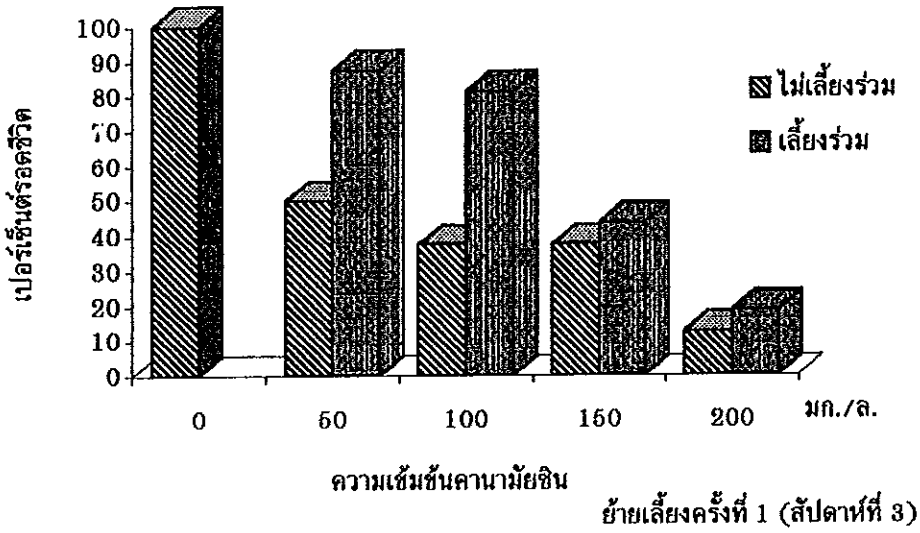
	ความเข้มข้นของคานามัยซิน (มก./ล.)				
วิธีการเลี้ยง	0	50	100	150	200
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1					
ไม่เลี้ยงร่วม	100	50.00 b	37.50 b	37.50	12.50
เลี้ยงร่วม		87.50 a	81.25 a	43.75	18.75
F-test		*	**	ns	ns
C.V(%)		25.71	22.74	48.65	86.41
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2					
ไม่เลี้ยงร่วม	100	12.50	6.25	0.00 b	0.00
เลี้ยงร่วม		12.50	6.25	6.25 a	0.00
F-test		ns	ns	**	
C.V.(%)		54.43	82.84	84.02	
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3					
ไม่เลี้ยงร่วม	100 (18)	0.00	0.00	0.00	0.00
เลี้ยงร่วม		6.25 (1)	0.00	0.00	0.00

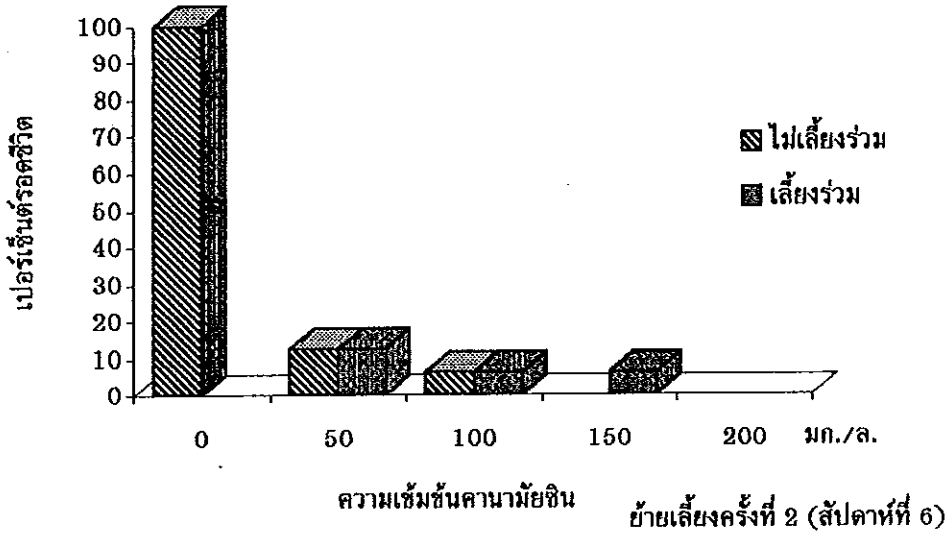
ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนการสร้างยอด

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

*,** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และมีนัยสำคัญยิ่ง(P<0.01) ตามลำดับ

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT





รูปที่ 11 ผลของคานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต
โนดูลาแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน

21.66 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเวลาในการเลี้ยงร่วมพบว่า เวลาเลี้ยงร่วมที่ 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุด 32.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการเลี้ยงร่วมที่เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 24 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10) เมื่อวิเคราะห์ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายเชื้อและเวลาในการเลี้ยงร่วม พบว่าสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 มีปฏิกิริยาสัมพันธ์กับการเลี้ยงร่วมที่เวลา 48 ชั่วโมง ทำให้โนดูลาแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต สูงกว่าการเลี้ยงร่วมที่เวลา 36 ชั่วโมง เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 12) เมื่อย้ายโนดูลาแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดและคัดเลือกหลังการปลูกถ่ายยีนในสูตร 1.3.2 (สัปดาห์ที่ 4) พบว่าโนดูลาแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตลดลงแต่มีแนวโน้มว่าการเลี้ยงร่วมกับเชื้อให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสสูงกว่าชุดเปรียบเทียบ โนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด 46.66 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือโนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 และสายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย 18.33 และ 17.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10) สำหรับเวลาในการเลี้ยงร่วมพบว่าเมื่อใช้เวลาในการเลี้ยงร่วมเพิ่มสูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสต่ำลง ทั้ง 3 สายเชื้อ เป็นไปในทำนองเดียวกัน ระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุดของโนดูลาแคลลัสคือ 24 ชั่วโมง รองลงมาคือเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมงซึ่งให้โนดูลาแคลลัสรอดชีวิต 22.5, 18.5 และ 16.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปฏิกิริยาสัมพันธ์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายเชื้อและเวลาในการเลี้ยงร่วม โนดูลาแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตน้อยมาก โนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย 6.66 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย 2.5 และ 1.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเวลาในการเลี้ยงร่วมที่ 24, 36 และ 48 ชั่วโมงให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเฉลี่ย 4, 3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหลังจากวางเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์ พบว่าโนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10, รูปที่ 15) ส่วนโนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อและเวลาอื่นๆ ไม่มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต โนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตยังไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ จากการสุ่มโนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตหลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ด้วยวิธีเนื้อเยื่อเคมี พบว่าไม่ปรากฏกิจกรรมของ GUS

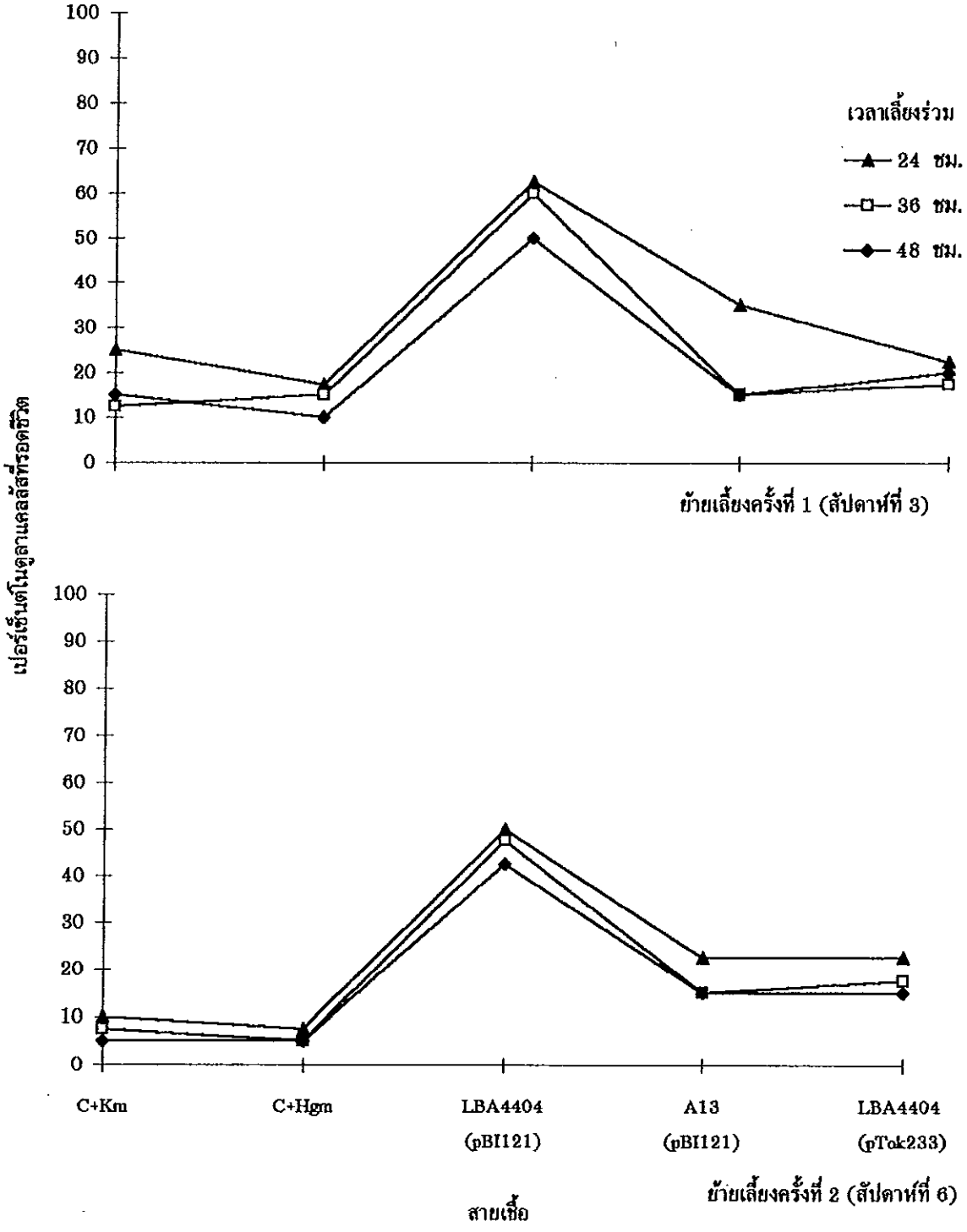
ตารางที่ 10 ผลของสายเชื้อและเวลาในการเลี้ยงร่วมต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส

สายเชื้อ	เวลาในการเลี้ยงร่วม (ชม.)				
	24	36	48	เฉลี่ย	F-test
สัปดาห์ที่ 3					
C+Km	25	12.5	15	17.5 bc	
C+Hgm	17.5	15	10	14.16 c	
LBA4404(pBI121)	62.5	60	50	57.5 a	
A13 (pBI121)	35	15	15	21.66 b	
LBA4404(pTok233)	22.5	17.5	20	20 b	
เฉลี่ย	32.5 a	24 b	22 b		**
F-test				**	
C.V. (%)					28.66
สัปดาห์ที่ 4					
C+Km	10	7.5	5	7.5 c	
C+Hgm	7.5	5	5	5.8 c	
LBA4404(pBI121)	50	47.5	42.5	46.66 a	
A13 (pBI121)	22.5	15	15	17.5 b	
LBA4404(pTok233)	22.5	17.5	15	18.3 b	
เฉลี่ย	22.5 a	18.5 ab	16.5 b		**
F-test				**	
C.V. (%)					29.79
สัปดาห์ที่ 5					
C+Km	2.5	2.5	0	1.66b	
C+Hgm	2.5	0	0	0.83b	
LBA4404(pBI121)	7.5	7.5	5	6.66a	
A13 (pBI121)	5	2.5	0	2.50b	
LBA4404(pTok233)	2.5	2.5	0	1.66b	
เฉลี่ย	4a	3ab	1b		*
F-test				*	
C.V. (%)					155.63

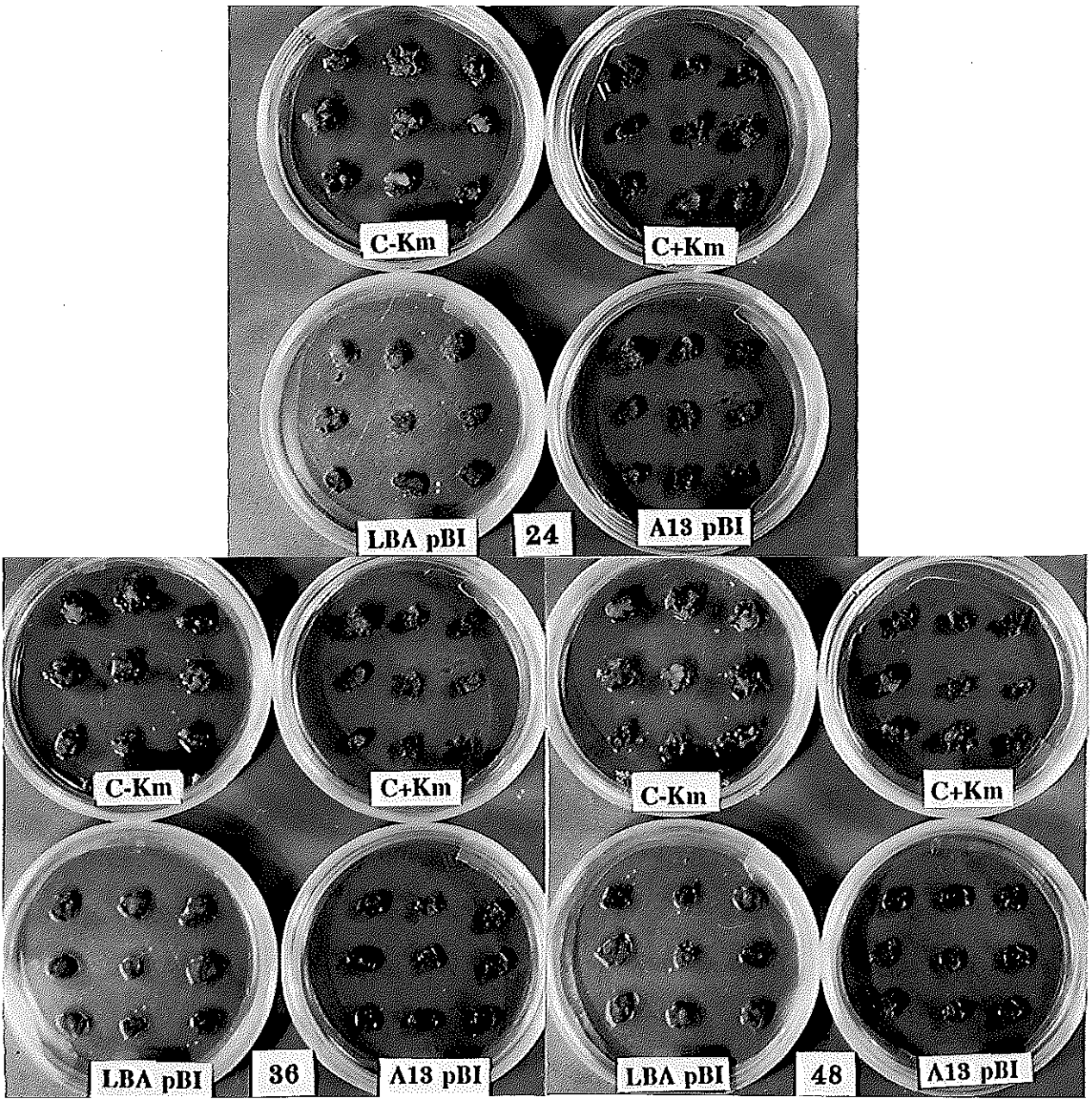
C = control , Km = Kanamycin , Hgm = Hygromycin

*,** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ตามลำดับ

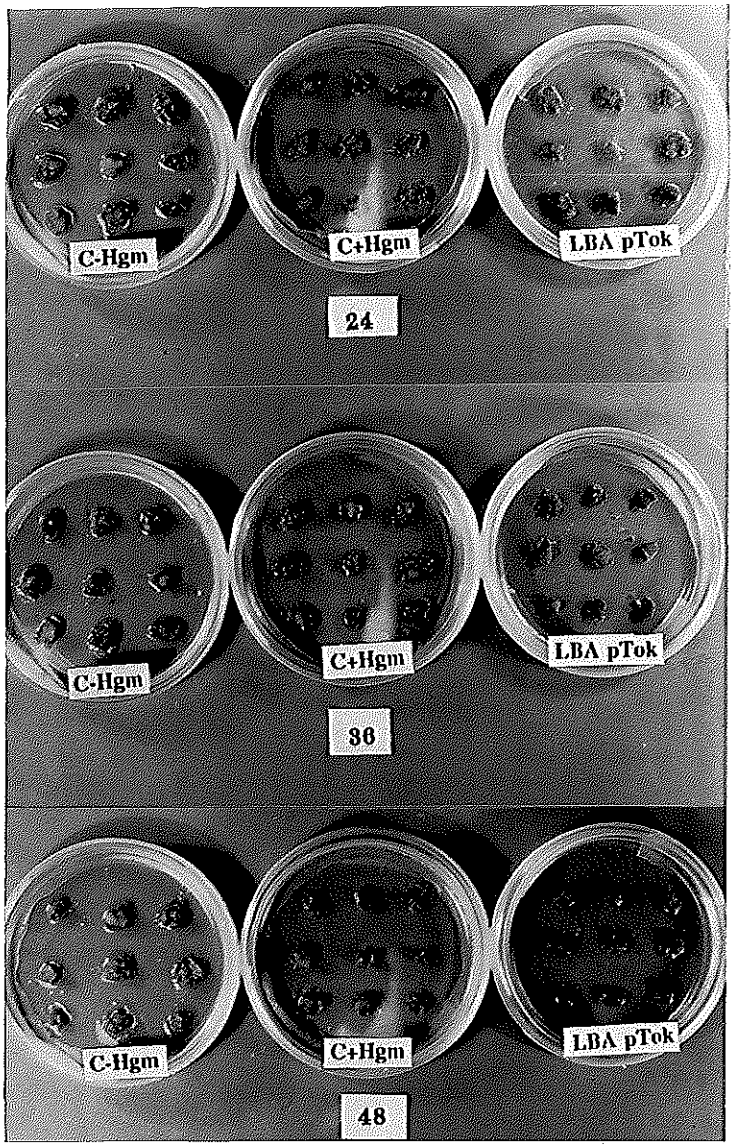
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในแถวหรือคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



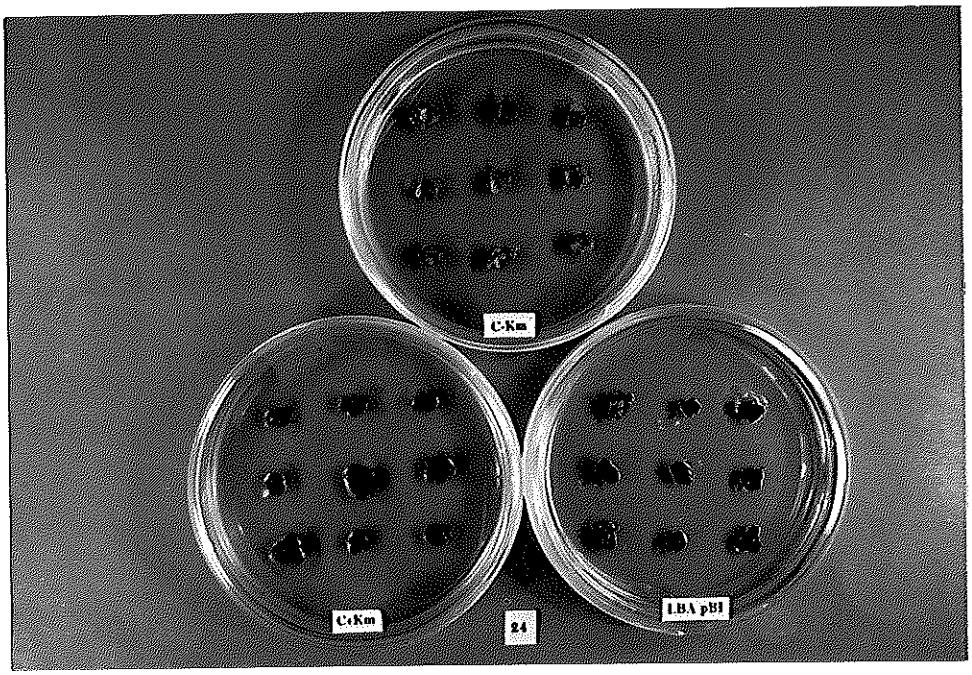
รูปที่ 12 ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายเชื้อและเวลาในการเลี้ยงร่วม



รูปที่ 13 โนดูลาแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) และสายเชื้อ A13 (pBI 121) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
C-Km: ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ และไม่เติมคานามัยซิน
C+Km: ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 14 โนดูลาแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 (pTok 233) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
C-Hgm: ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ และไม่เติมไฮโกรมัยซิน
C+Hgm: ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 15 โนดูลาแคลลัสที่เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

C-Km: ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ และไม่เติมคานามัยซิน

C+Km: ไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

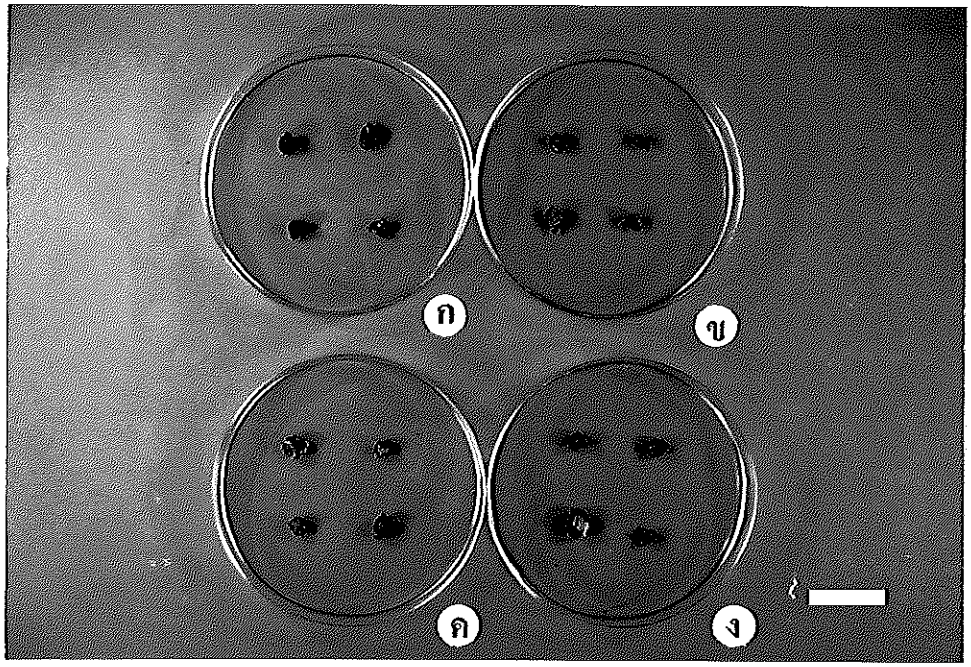
3.4 การศึกษาความหนาแน่นของเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

ผลของการเลี้ยงโนดูลาแคลลัสร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121ที่ความหนาแน่นของเชื้อ 3 ระดับ พบว่าการใช้เชื้อที่ความหนาแน่น $6.1x10^8$ และ $9.8x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้โนดูลาแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเท่ากัน 25 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือการใช้เชื้อความหนาแน่น $3.75x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 12.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตต่ำสุด คือ 6.25 เปอร์เซ็นต์ บริเวณรอบๆ ก้อนของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และไม่สามารถชักนำการสร้างยอดได้ ขณะที่การใช้เชื้อความหนาแน่น $9.8x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดสูงสุดเฉลี่ย 15.62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อที่ความหนาแน่น $6.1x10^8$ และ $3.75x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเฉลี่ย 9.37 และ 3.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11 รูปที่ 16) และจากการสุ่มโนดูลาแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนมาตรวจสอบกิจกรรมของ GUS โดยวิธีเนื้อเยื่อเคมี พบว่าไม่ปรากฏกิจกรรมของ GUS

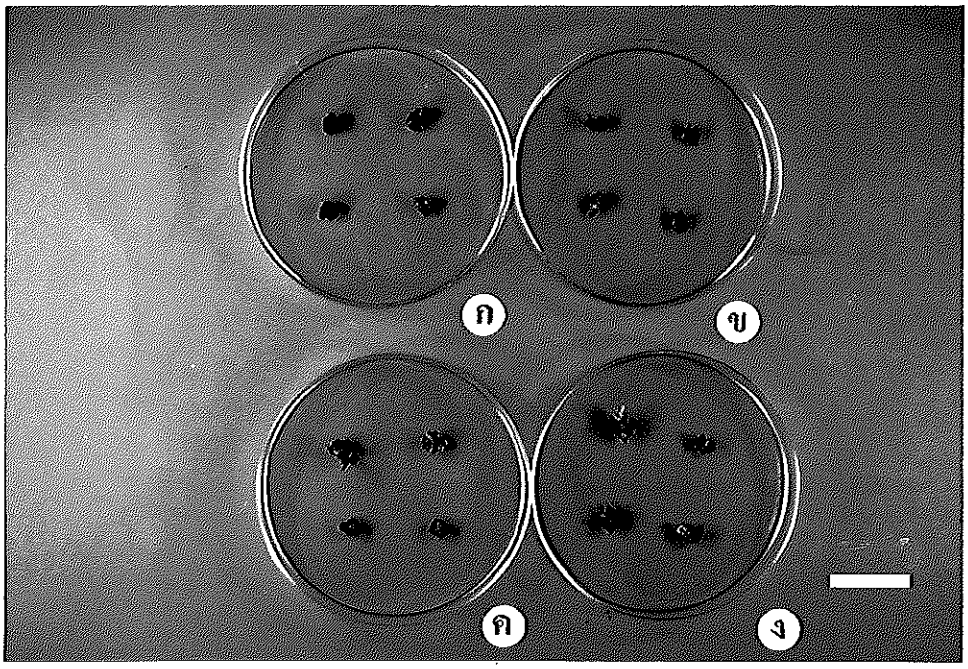
ตารางที่11 เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสที่ความหนาแน่นของเชื้อ 3 ระดับ บนอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความหนาแน่นของเชื้อ	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์สร้างยอดเฉลี่ย
ชุดเปรียบเทียบ	6.25 b	0.00 c
$3.75x10^7$	12.50 ab	3.12 bc
$6.10x10^8$	25.00 a	9.37 ab
$9.80x10^9$	25.00 a	15.62 a
F-test	**	**
C.V (%)	46.19	44.44

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)
ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



3 สัปดาห์



6 สัปดาห์

รูปที่ 16 โนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตและการสร้างยอด ในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลาต่างกัน (บาร์ = 2.85 เซนติเมตร)

(ก) ไม่เลี้ยงร่วม

(ข) เลี้ยงร่วมด้วยความหนาแน่น 3.75×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(ค) เลี้ยงร่วมด้วยความหนาแน่น 6.1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

(ง) เลี้ยงร่วมด้วยความหนาแน่น 9.8×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.5 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิค

ผลจากการใช้เครื่องอัลตราโซนิคเพื่อกระตุ้นหรือส่งเสริมในการส่งถ่ายยีนให้กับโนดูลาแคลลัสเป็นเวลา 5, 10 และ 15 วินาที เปรียบเทียบกับหน่วยทดลองที่เลี้ยงร่วมโดยไม่ใช้อัลตราโซนิค และหน่วยทดลองที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อ พบว่าการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 วินาที ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 วินาที หน่วยทดลองที่ไม่ได้ใช้อัลตราโซนิคและหน่วยทดลองเปรียบเทียบซึ่งให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 43.70, 25 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 5 วินาที ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตต่ำสุดเพียง 18.25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 วินาที ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด 21.87 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 วินาที และหน่วยทดลองที่ไม่ได้ใช้อัลตราโซนิคให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเฉลี่ยเท่ากันคือ 20.31 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 5 วินาที ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเฉลี่ยต่ำสุด 17.18 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าทุกหน่วยทดลองให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12 รูปที่ 17) และจากการสุ่มโนดูลาแคลลัสที่รอดชีวิตหลังปลูกถ่ายยีนมาตรวจสอบกิจกรรมของ GUS โดยวิธีเนื้อเยื่อเคมี พบว่าไม่มีกิจกรรมของ GUS

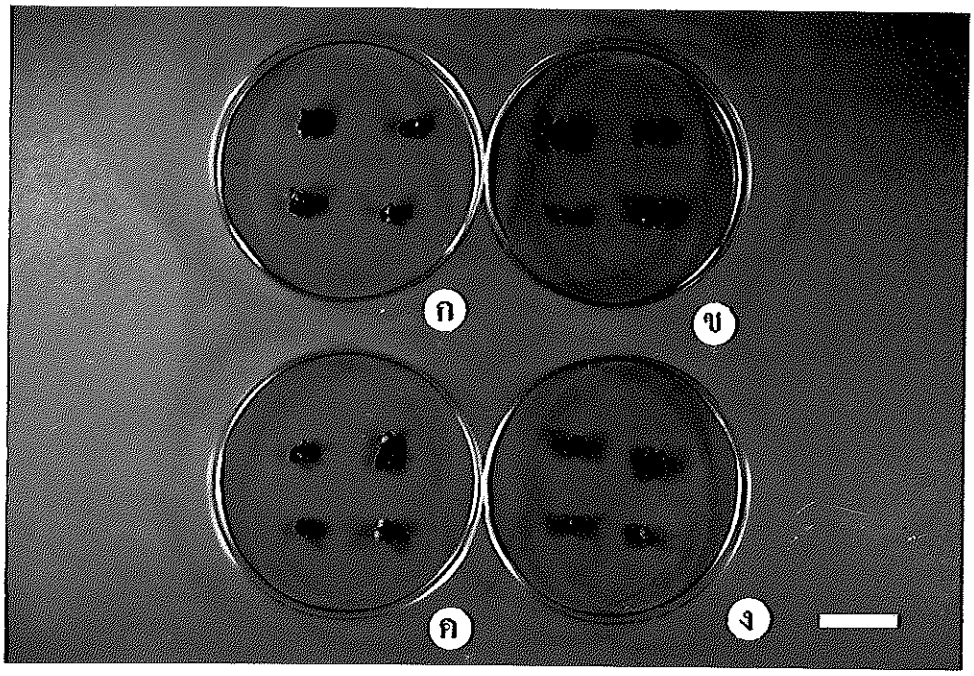
ตารางที่ 12 ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมโดยใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลาต่างๆ ต่อการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง 6 สัปดาห์

เวลา (วินาที)	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์สร้างยอดเฉลี่ย
0	25.00 bc	20.31
5	18.75 c	17.18
10	50.00 a	21.87
15	43.70 ab	20.31
F-test	*	ns
C.V. (%)	39.28	27.54

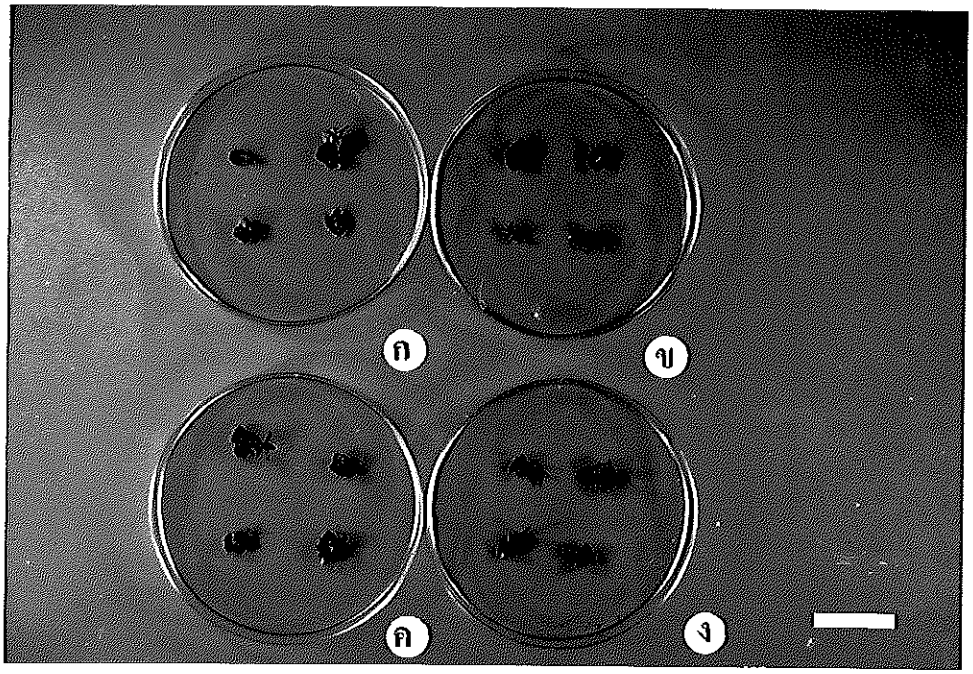
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อตรวจสอบด้วย DMRT



3 สัปดาห์



6 สัปดาห์

รูปที่ 17 ลักษณะการสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสในอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลาต่างกัน (บาร์ = 2.85 เซนติเมตร)

(ก) เลี้ยงร่วมโดย ไม่ใช้อัลตราโซนิค

(ข) ใช้อัลตราโซนิค 5 วินาที

(ค) ใช้อัลตราโซนิค 10 วินาที

(ง) ใช้อัลตราโซนิค 15 วินาที

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาการเตรียมใบมังคุด

ผลการเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบ 1/4, 1/2, 3/4 และความเข้มข้นปกติ เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงกลุ่มตารวมมังคุด พบว่ากลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการเติมอาหารเหลว ไม่ส่งเสริมการยืดยาวของยอด ขณะที่การเติมอาหารเหลว ส่งเสริมการยืดยาวของยอดและการสร้างใบสีแดงเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะการเติมอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) เป็นระดับความข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ใบสีแดงสูงสุด เป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองของ สมปอง และคณะ (2535) รายงานว่าอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์กลุ่มตารวมสูงสุด 33.33 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำยอดรวมสูงสุดเฉลี่ย 40 ยอดต่อใบ ส่วนระยะเวลาการเติมอาหารเหลวที่เหมาะสมที่สุดคือ 2 สัปดาห์ หลังจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร WPM ซึ่งให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มตารวม ความยาวยอดเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์ใบสีแดง สูงสุด (ตารางที่ 2 รูปที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากการเติมอาหารเหลวที่เวลา 2 สัปดาห์ เป็นการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตแทนสูตรอาหารเดิมที่ถูกใช้ไปและปริมาณลดลงในระดับหนึ่งจึงสามารถช่วยในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ ทำให้จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์ใบสีแดงเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่าการเติมอาหารเหลวระยะเวลาต่างๆ มีผลต่อการยืดยาวของยอดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มตารวมที่ไม่เติมอาหารเหลว ไซโตไคนินชนิดต่างๆ ที่เติมลงในอาหาร 1/2 MS ที่ใช้ส่งเสริมการยืดยาวของยอด ความเข้มข้นอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลแตกต่างกันโดยการเติม BA ร่วมกับ TDZ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้ไซโตไคนินชนิด TDZ เพียงอย่างเดียว TDZ ส่งเสริมการสร้างแอนโธไซยานินและการบิดเบี้ยวของใบ ใบไม่สร้างลำต้น ในขณะที่ BA เพียงอย่างเดียวให้ใบที่แข็งและด้านไม่เหมาะต่อการสร้างแคลลัส ในทางตรงข้ามกลับส่งเสริมการยืดยาวของยอดเหมาะที่จะใช้ชักนำราก Huetteman และคณะ (1993) รายงานการใช้ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลาร์ (0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร) ว่าสามารถชักนำการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็งประเภทเมล็ดพันธุ์สด ได้มากกว่าการใช้ไซโตไคนินชนิดอื่น และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นเมื่อใช้ TDZ ร่วมกับ IAA และ BA แม้ว่า TDZ มีประสิทธิภาพในการชักนำยอดรวมได้สูง แต่ยังขึ้นอยู่กับชนิด และพันธุ์ของพืช Korban และคณะ (1992) ทดสอบผลการใช้ TDZ กับแอปเปิล 7 พันธุ์ พบว่าแอปเปิลแต่ละพันธุ์

ตอบสนองต่อ TDZ โดยให้จำนวนยอดต่างกัน ใบของแอปเปิลพันธุ์ McIntosh ให้ยอดรวมสูงสุดเมื่อใช้ TDZ ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า TDZ มีผลในการยับยั้งการยืดยาวของยอด ขณะที่การเติมอาหารเหลวที่มี BA ช่วยส่งเสริมการยืดยาวของยอดและให้พื้นที่ใบได้สูงสุด Nieuwherk และคณะ (1986) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของแอปเปิล บนอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog medium) เติม TDZ ความเข้มข้น 10 ,1 และ 0.1 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมและให้ยอดขนาดใหญ่กว่าการใช้ BA แต่พบว่าการใช้ TDZ ให้ยอดที่สั้นกว่า และใบที่พัฒนาแคบกว่าการใช้ BA และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเติมอาหารเหลวที่มี BA ร่วมกับ TDZ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างใบสีแดงได้สูงสุด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับหน่วยทดลองอื่นๆ ใบสีแดงเป็นผลมาจาก TDZ ส่งเสริมการสร้างรงควัตถุพวกแอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีม่วงแดง แต่พบว่ากลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เพียงอย่างเดียวสามารถให้ใบสีแดงได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากรงควัตถุพวกแอนโธไซยานินอาจถูกสร้างมาจากสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรทและไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยง จากการทดลองของ Cordts และคณะ (1987) รายงานผลของคาร์โบไฮเดรทและไนโตรเจนต่อการพัฒนาของแอนโธไซยานินกับการสร้างใบสีแดงของท้อ (*Prunus persica* L.) โดยการวิเคราะห์ cyanidin 3-glucoside ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสร้างแอนโธไซยานิน พบว่าอาหารที่เติม NH^{+}_{4} 5 มิลลิโมลาร์ ร่วมด้วย NO^{-}_{3} 10 มิลลิโมลาร์ และซูโครส 234 มิลลิโมลาร์ มีผลในการกระตุ้นการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุด แต่จากการศึกษาครั้งนี้ ใบสีแดงส่วนใหญ่มาจากการเติม TDZ ในอาหารเพาะเลี้ยง

2. การชักนำแคลลัส

2.1 การศึกษาผลของสูตรอาหารที่เตรียมใบอ่อนสีแดงต่อการสร้างแคลลัส

การเตรียมใบมีผลต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส ใบที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แคลลัสต่ำ ในขณะที่การเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ส่งเสริมการสร้างแคลลัส ทั้งนี้เนื่องจากใบจากกลุ่มตารวมที่วางเลี้ยงโดยการเติมอาหารเหลว ใบมีลักษณะอวบน้ำ เส้นกลางใบมีขนาดใหญ่ เห็นได้ชัดเจน อาจเกิดจากกลุ่มเซลล์บริเวณมัดท่อน้ำท่ออาหารและเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิสมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว หรืออาจเกิดจากไซโตไคนินในรูป TDZ ชักนำการสร้างแอนโธไซยานิน หรือส่งผลให้ใบมังคุดสีแดงมีการแบ่งเซลล์พัฒนาให้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในทำนองเดียวกับการทดลองของ Te-chato และคณะ (1995c) ซึ่งรายงานการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนเอ็มบริออยด์ได้สูงจากใบอ่อนสีแดงที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ นอกจากนี้ยังรายงานอีกว่า TDZ สามารถส่งเสริมการสร้างแอนโธไซยานิน และชักนำการสร้างแคลลัส ขณะที่ BA ก็สามารถชักนำการสร้างแอนโธไซยานิน แต่ไม่สามารถชักนำการสร้างแคลลัส การใช้ BA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำแอนโธไซยานิน และส่งเสริมการสร้างแคลลัส Huetteman และ คณะ (1993) รายงานการใช้ TDZ ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถใช้ในการขยายพันธุ์ไม้เนื้อแข็งหลายชนิด เพิ่มปริมาณในหลอดทดลองได้ดีกว่าการใช้ไซโตไคนินชนิดอื่น และใช้ความเข้มข้นต่ำ Mok และคณะ (1982) รายงานว่า TDZ เป็นไซโตไคนินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสถั่วราชมาษ (*Phaseolus tunatus* cv. Kingston) ความสามารถในการสร้างแคลลัสขึ้นอยู่กับ อาหารเพาะเลี้ยง สภาพวางเลี้ยง ฮอร์โมนพืช รวมทั้งการเตรียมชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม Goh และคณะ (1994) รายงานการสร้างบาดแผลโดยการตัดแบ่งใบมีประสิทธิภาพในการชักนำตายอดจากใบมังคุด ขณะที่การวางเลี้ยงทั้งใบโดยไม่มีการสร้างบาดแผล ไม่สามารถชักนำการสร้างตายอดได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าอาหารเติม TDZ และ BA สามารถให้ใบสีแดงและให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้สูงกว่าการใช้ BA หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว และมีการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดบริเวณโคนใบ แคลลัสดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าแคลลัสจากเส้นกลางใบ ปลายใบ และแผ่นใบ อาจเนื่องจากแคลลัสบริเวณโคนใบมีธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตปริมาณสูงกว่าบริเวณอื่น

2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ใช้ในการปลูกถ่ายยีน

การเตรียมแคลลัสเพื่อใช้เป็นวัสดุในการปลูกถ่ายยีน โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสหรือสูตรเพิ่มปริมาณ เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและให้ได้แคลลัสที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า หลังวางเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 15-25 วัน แคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากระยะนี้เซลล์ได้รับอาหารที่เพียงพอ ทำให้เซลล์แต่ละเซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เพิ่มขนาดและให้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ มีลักษณะกลมเป็นกลุ่มก้อน ภายในเซลล์มีกิจกรรมการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีความเข้มข้นของไซโทพลาสซึมสูง ดังนั้นระยะนี้เป็นระยะที่เหมาะสมในการนำแคลลัสมาใช้ในการปลูกถ่ายยีน อย่างไรก็ตาม ชนิดของพืช พันธุ์พืช หรือชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันย่อมมีอัตราการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการที่แตกต่างกัน (สมปอง เตชะโต, 2536) เมฆา ชาติกุล (2536) รายงานการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนชั้วเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน อาหารเลี้ยงต้นอ่อน และใบเลี้ยงของเมล็ดอ่อนยางพารา ว่าชิ้นส่วนแต่ละชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และแคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดหลังจากการย้ายเลี้ยงทุกๆ 30 วัน และเมื่อย้ายเลี้ยงจำนวน 2-4 ครั้ง สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ได้ หากไม่มีการย้ายเลี้ยงหรือย้ายเลี้ยงหลังระยะเวลาดังกล่าวทำให้อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง เช่นเดียวกับการทดลองของ พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ (2538) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดยางพาราพันธุ์พื้นเมือง ว่าการย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 3 สัปดาห์ ทำให้แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตและมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วหากไม่มีการย้ายเลี้ยงภายในเวลา 3 สัปดาห์ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์ที่มีสีน้ำตาล ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ แคลลัสมีอัตราการเจริญสูงสุดหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 25 วันหลังจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสเริ่มลดลง โดยบริเวณรอบๆ ก้อนแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายกระจายอยู่ทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากการวางเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานทำให้ชิ้นส่วนแคลลัสที่สัมผัสกับอาหารมีการสร้างสารประกอบพวกฟีโนลิค ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เซลล์ปลดปล่อยออกมาทำให้ชิ้นส่วนแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสหรือทำให้คุณภาพของแคลลัสลดลง ดังนั้นระยะเวลาการย้ายเลี้ยงที่เหมาะสมหรือการนำแคลลัสไปใช้ในการปลูกถ่ายยีนคือ อายุหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

3. การศึกษาวิธีการปลูกถ่ายยีนผ่านโนดูลาแคลลัส

3.1 ผลของซีโฟทาซิมต่อความต้านทานของโนดูลาแคลลัสและการสร้างยอด

ซีโฟทาซิมความเข้มข้นในช่วง 50 ถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการพัฒนาของโนดูลาแคลลัส ความเข้มข้นสูงกว่านี้ (400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่เหมาะที่จะใช้กำจัดเชื้อหลังการปลูกถ่ายเพราะการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของมังคุดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดลองของ Gama และคณะ (1996) รายงานว่าซีโฟทาซิมเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังการปลูกถ่ายยีนกับแคลลัสมันเทศ แต่พบว่าซีโฟทาซิมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสมีชีวิตรอดลดลง ดังนั้นก่อนที่จะมีการปลูกถ่ายยีนผ่านอะโกรแบคทีเรีย มีความจำเป็นต้องกำจัดเชื้อส่วนเกินที่มีผลต่อการปนเปื้อนแต่ไม่ยับยั้งการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของชิ้นส่วน หรือแคลลัสที่มีการปลูกถ่าย ในการกำจัดนั้นอาจใช้สารปฏิชีวนะซึ่งมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีผลแตกต่างกันออกไป การใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เช่น จากการรายงานการทดลองของ Shackelford และ Chlan (1996) รายงานการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน พบว่าซีโฟทาซิมมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการกำจัดสายเชื้อ LBA 4404 และโมซาแลคแทม สามารถกำจัดสายเชื้อ EHA 101 ได้ดีที่สุด ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ระดับ 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการสร้างยอดของแคลลัส แต่ความเข้มข้นที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการสร้างยอดจากแคลลัส ขณะที่ Lowe และคณะ (1993) รายงานว่าซีโฟทาซิมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินของชิ้นส่วนลำต้นเบญจมาศหลังเลี้ยงร่วมกับเชื้อ โดยไม่มีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าซีโฟทาซิมช่วยส่งเสริมการสร้างยอดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมซีโฟทาซิม แต่ซีโฟทาซิมความเข้มข้นสูง (400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถยับยั้งการสร้างยอดจากแคลลัสมังคุด จะเห็นว่าพืชตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับ ชนิดของสาร ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ รวมทั้งชนิดและชิ้นส่วนของพืช สำหรับแคลลัสของมังคุด ใช้ความเข้มข้นของซีโฟทาซิมที่ระดับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อและไม่มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัส

3.2 การศึกษาผลของคานามัยซินต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลา แคลลัส

การใช้คานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้คัดเลือกโนดูลาแคลลัสหลังปลูกถ่ายยีน ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสรอดชีวิตแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโนดูลาแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลานาน (6 สัปดาห์) บนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสไม่มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต และจากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ในชิ้นส่วนแคลลัส ไม่พบกิจกรรมของ GUS ทั้งนี้เนื่องจากยีนยังไม่มีการส่งถ่าย T-DNA หรืออาจส่งได้น้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบความต้านทานของแคลลัสต่อคานามัยซินที่ระดับดังกล่าว ความสามารถในการทนทานต่อคานามัยซินขึ้นอยู่กับสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ ชนิดของพืช และชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการปลูกถ่ายยีน ดังรายงานการทดลองของ Blay และ Oakes (1996) รายงานว่าการใช้คานามัยซินความเข้มข้น 100-150 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการคัดเลือกกับชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือหลังจากเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มียีน *npt* II เป็นยีนคัดเลือกและ GUS เป็นยีนรายงานผล ส่วนคานามัยซินความเข้มข้น 200-250 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการคัดเลือกกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ในขณะที่ Pena และคณะ (1995b) รายงานว่าการใช้คานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกชิ้นส่วนลำต้นหลังจากเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ EHA ที่มีพลาสมิด pGA 472 ได้มากที่สุด Stephen และคณะ (1994) รายงานการปลูกถ่ายยีนใบโกโก้โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A 281 ที่มีพลาสมิด pGpTV พบว่าสามารถคัดเลือกชิ้นส่วนได้ดีบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เพิ่มขึ้นครั้งละ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการย้ายเลี้ยง 1 ครั้ง จนกระทั่งถึงระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการปลูกถ่ายยีนกับโกโก้ 7 สายพันธุ์ พบว่าสามารถตรวจสอบการปลูกถ่ายยีนได้ 3 สายพันธุ์ แต่แคลลัสที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ในขณะที่ Karthikeyan และคณะ (1996) รายงานการคัดเลือกแคลลัสถั่วเขียวเมล็ดดำ (*Vigna mungo*) ที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนบนอาหารที่เติมคานามัยซินได้ถึง 900 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองในมังคุด แคลลัสมีความทนทานต่อคานามัยซินที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับพืชหลายชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว การใช้คานามัยซินที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินไปอาจทำความเสียหายต่อเซลล์ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากชิ้นส่วนของแคลลัสมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน มีการสัมผัสกับสารได้โดยตรง และแคลลัสมังคุดมีการเจริญเติบโตช้า รวมทั้งเป็นพืชที่มีการสร้างสารประกอบพวกฟีโนลิคได้สูงด้วย จึงเห็นได้ว่าความสามารถในการทนทานต่อคานามัยซินขึ้นอยู่กับ ชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษา

3.3 การศึกษาชนิดของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและเวลาที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน

จากการปลูกถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายเชื้อ เลี้ยงร่วมกับโนดูลาแคลลัส 3 เวลา สามารถให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนขึ้นอยู่กับชนิดของสายเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ที่มีความจำเพาะกับชนิดหรือชิ้นส่วนของพืชในการส่ง T-DNA เข้าสู่พืชอาศัยนั้นๆ เช่นเดียวกับการทดลองของ Benjamin และคณะ (1993) รายงานการใช้สายเชื้อ 3 สายเชื้อในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของระย่อม (*Rauvolfia serpentina*) ว่ามีเพียง *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ 15434 เท่านั้นที่สามารถปลูกถ่ายยีนได้และให้รากลอยจำนวนมาก การปลูกถ่ายยีนนอกจากขึ้นอยู่กับ ชนิดและสายเชื้อของอะโกรแบคทีเรียแล้ว พบว่าความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการ คือ ระยะเวลาในการอินคิวเบทเชื้อ ความหนาแน่นของเชื้อหรือระยะเวลาในการเลี้ยงร่วม จากการปลูกถ่ายยีนในระย่อม พบว่าการนำเชื้อที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาเลี้ยงร่วมกับตาข้างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะต่อการส่งถ่ายยีนซึ่งให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังปลูกถ่ายยีนสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเวลาดังกล่าวของอะโกรแบคทีเรียมีความพร้อมในการส่งถ่ายยีนและการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านหรือพืชอาศัย และเหตุผลที่สำคัญอีกประการหนึ่งอาจเนื่องจากแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าหลังวางเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 5 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดชีวิตมีน้อยมาก แคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตเพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเวลาเลี้ยงร่วมอื่นๆ ไม่มีเปอร์เซ็นต์แคลลัสรอดชีวิต สาเหตุอย่างหนึ่งอาจเกิดจากการเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมง เชื้อมีความหนาแน่นสูงกว่าการเลี้ยงร่วมที่ 24 ชั่วโมง อันเนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณในระหว่างอินคูเบททำให้การกำจัดเชื้อส่วนเกินหลังเลี้ยงร่วมเป็นไปได้ยาก ทั้งนี้เนื่องจากการกำจัดเชื้อครั้งแรกด้วยซีโฟทาซิมได้ไม่หมด ทำให้เชื้อสามารถเจริญขึ้นบนชิ้นส่วนได้อีกครั้งหนึ่ง จึงมีการกำจัดเชื้อครั้งที่สองบนอาหารแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและในอาหารเป็นเวลาอีก 12 ชั่วโมง การกำจัดเชื้อหลายๆ ครั้งเป็นระยะเวลานานๆ ทำให้ชิ้นส่วนพืชที่สัมผัสกับซีโฟทาซิมโดยตรงเกิดความเสียหายได้ ชิ้นส่วนดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาและตายในที่สุด ดังนั้นควรใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพื่อการกำจัดเชื้อให้หมดภายในครั้งเดียว และจากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบกิจกรรมดังกล่าว เป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองของ Lowe และคณะ (1993) รายงานว่าภายหลังการปลูกถ่ายยีนในเบญจมาศโดยเชื้อทั้ง 17 สายเชื้อ แคลลัสที่ได้ไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้ในการปลูกถ่ายยีนได้ ไม่สามารถพบกิจกรรมของ GUS แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเท่านั้นยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ผลความล้มเหลวในการปลูกถ่ายยีนอาจเป็นเพราะโปรโมเตอร์ของ GUS ไม่ทำงาน ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ซึ่งยังไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ได้อาจเนื่องมาจากโปรโมเตอร์ของ GUS ไม่ทำงาน หรือมีการส่งถ่ายเฉพาะยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินเข้าไปเท่านั้น เพื่อเป็นการยืนยันในการปลูกถ่ายยีนจึงจำเป็น

ต้องมีการตรวจสอบยีน GUS ระดับ DNA หลังจากได้แคลลัสหรือต้นที่ชักนำจากแคลลัสที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน

3.4 การศึกษาความหนาแน่นของเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส

จากการใช้โนดูลาแคลลัสเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 พลาสมิด pBI 121 ระดับความหนาแน่น $6.1x10^8$ และ $9.8x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์โนดูลาแคลลัสรอดชีวิตหลังการปลูกถ่ายยีนสูงสุด แต่ความหนาแน่นทั้ง 3 ระดับสามารถให้ยอดรวมจากโนดูลาแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน มีแนวโน้มว่าการใช้เชื้อที่ระดับความหนาแน่นสูงให้ผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนสูงด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Lin และคณะ (1994) พบว่าการใช้ระดับความหนาแน่นที่สูงขึ้นช่วยให้ประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนกับยาสูบและ *Arabidopsis thaliana* ได้สูง ในขณะที่การทดลองของ Pena และคณะ (1995b) พบว่า การใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pMON9793 ระดับความหนาแน่น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถปลูกถ่ายยีนในส้มได้ดีกว่าการใช้เชื้อที่ระดับความหนาแน่น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร การใช้ระดับความหนาแน่นเชื้อจึงขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืช ชนิดของพืช รวมทั้งวิธีการเลี้ยงร่วม Stephen และคณะ (1994) ได้ทำการปลูกถ่ายยีนในใบโกโก้โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A281 มีพลาสมิด pGPTV ความหนาแน่น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินได้ 7 เปอร์เซ็นต์ แต่แคลลัสดังกล่าวยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ สำหรับการปลูกถ่ายยีนในส้มเขียวหวานโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 ความหนาแน่นของเชื้อ $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนลำต้น ชิ้นส่วนที่เลี้ยงร่วมสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ จากการตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี Southern hybridization พบว่าสามารถปลูกถ่ายยีนได้ 7.9 เปอร์เซ็นต์ (Pena *et al.*, 1995a) และ Confalonicri และคณะ (1997) รายงานการปลูกถ่ายยีนในใบ *Populus deltoides* โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A281 ที่มีพลาสมิด pKIWI 105 ความหนาแน่นของเชื้อ $1.2x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้แคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีความต้านทานต่อคานามัยซิน และสามารถตรวจสอบ DNA ได้ด้วยวิธี Southern hybridization จากการศึกษาครั้งนี้ถึงแม้ได้จำนวนยอดจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อทุกระดับความหนาแน่นในขณะที่การทดลองชุดเปรียบเทียบไม่มีการสร้างยอด แต่จำนวนยอดที่ได้ยังไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ได้ ความสามารถในการสร้างยอดทุกระดับความหนาแน่นเชื้ออาจเกิดจากการถูกเหนี่ยวนำจากเซลล์รอบๆ โนดูลาแคลลัสเพียงบางเซลล์หรือได้รับการกระตุ้นจากองค์ประกอบของสารอาหาร สารปฏิชีวนะ รวมทั้งจากการส่งถ่าย T-DNA จากนั้นเซลล์ที่อยู่รอบนอกดังกล่าวที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคงเหลือแต่เซลล์ชั้นในที่ยังมีสีเขียวอยู่ จึงทำให้การเลี้ยงร่วมกับเชื้อแล้วนำไปวางเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างยอดทันทีมีการสร้างยอดบนอาหารที่เติมคานามัยซิน โดยเฉพาะเซลล์ชั้นในที่ไม่ได้สัมผัสกับคานามัยซินโดยตรงหรืออาจมีการดูดซึมช้ากว่า รวมทั้งอาจได้รับการส่งถ่าย T-DNA ดังนั้นการใช้ความหนาแน่นของเชื้อกับการปลูกถ่ายยีนวิธีดังกล่าวมังคุดอาจใช้

ระดับความหนาแน่นของเชื้อได้สูงมากกว่าพืชชนิดอื่นดังกล่าวข้างต้น การสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสมังคุดบนอาหารเติมคานามัยซินที่ใช้ในการคัดเลือกหลังการเลี้ยงร่วมยังไม่เป็นตัวชี้ชัดถึงการประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนครั้งนี้ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ได้

3.5 การศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิค

การใช้เครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 และ 15 วินาที เป็นเวลาที่เหมาะต่อการใช้กระตุ้นหรือส่งเสริมการส่งถ่ายยีนให้กับโนดูลาแคลลัส และพบว่าทุกหน่วยการทดลองที่ใช้อัลตราโซนิคและและหน่วยทดลองที่เลี้ยงร่วมโดยไม่ใช้อัลตราโซนิคสามารถให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของโนดูลาแคลลัสได้ ในขณะที่ชุดเปรียบเทียบที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อทำให้แคลลัสตายทั้งหมดไม่มีการสร้างยอด ถึงแม้ว่าทุกหน่วยการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส แต่การใช้อัลตราโซนิคให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงกว่า ดังนั้นการใช้อัลตราโซนิคสามารถกระตุ้นการส่งถ่าย T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียเข้าไปยังเซลล์ของโนดูลาแคลลัสได้ การส่งถ่าย T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียสามารถส่งเข้าสู่พืชได้ดีบริเวณบาดแผลหรือรอยตัดรอบๆ ชิ้นส่วนพืชตลอดจนเซลล์มัดท่อน้ำท่ออาหาร (Pena *et al.*, 1995a) แต่จากการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสมังคุดครั้งนี้ไม่มีการสร้างแผลกับชิ้นส่วนเนื่องจากแคลลัสมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนการสร้างบาดแผลให้กับโนดูลาแคลลัสเซลล์อาจมีการสร้างสารประกอบพวกฟีโนลิค ทำอันตรายต่อเซลล์ทำให้การส่งถ่ายยีนเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น ดังนั้นการใช้อัลตราโซนิคจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนให้ประสบผลสำเร็จยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสมังคุด สามารถตรวจสอบได้เพียงยีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อคานามัยซินเท่านั้น ยังไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของ GUS จึงไม่สามารถยืนยันการปลูกถ่ายยีนได้แน่ชัด ดังนั้นอาจตรวจสอบโดยการใช้วิธีการอื่นเข้าช่วย เช่นการตรวจสอบเอนไซม์ หรืออาจตรวจสอบระดับ DNA

การปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสให้ประสบผลสำเร็จยิ่งขึ้นอาจต้องใช้วิธีการอื่นเข้าช่วย เช่น การเหนี่ยวนำด้วยสารพวกอะซิโตไซริงกอน หรืออาจใช้วิธีการยิงยีน หรือการเหนี่ยวนำด้วยกระแสไฟฟ้า

บทที่ 5

สรุป

การเพาะเลี้ยงแคลลัสมังคุดและการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

1. การเติมอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นไฟตาเจล 0.25 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มตารวม และเปอร์เซ็นต์ใบสีแดงสูงสุด ในขณะที่อาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการยืดยาวของยอดและให้พื้นที่ใบสูงสุด

2. การชักนำการสร้างแคลลัสจากใบสีแดงจากการเตรียมเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด ตำแหน่งการสร้างแคลลัสของใบสร้างได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง และสร้างได้ดีที่สุดบริเวณโคนใบ แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณและพัฒนาการเป็นโนดูลาแคลลัสจัดเป็นแคลลัสที่มีโครงสร้างที่เกาะตัวกันแน่น มีสีเขียวหรือเหลือง

3. การเจริญของแคลลัสแบ่งเป็น 3 ช่วง ช่วงแรกเซลล์มีการดูดน้ำและธาตุอาหารเพื่อใช้ในกิจกรรมการแบ่งเซลล์ อยู่ในช่วง 5-10 วัน หลังจากวางเลี้ยง ช่วงที่สองเป็นระยะเวลาการเจริญเติบโตสูงสุด อยู่ในช่วง 15-25 วัน หลังจากวางเลี้ยง ช่วงที่สามเป็นระยะที่เซลล์หยุดการแบ่งตัว อยู่ในช่วง 25-30 วัน หลังวางเลี้ยง ดังนั้นควรย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารใหม่หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน เพื่อให้ได้แคลลัสที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน

4. ซีโฟทาซิมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังการปลูกถ่ายยีนและสามารถให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัสและส่งเสริมการสร้างยอดได้สูงสุด ส่วนความเข้มข้นที่ระดับ 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์โนดูลาแคลลัสลดลงและยับยั้งการสร้างยอด

5. คานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการใช้คัดเลือกโนดูลาแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน ความเข้มข้นดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของโนดูลาแคลลัส 6.25 เปอร์เซ็นต์ และโนดูลาแคลลัสสามารถชักนำการสร้างยอดได้ ขณะที่การใช้คานามัยซินความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ส่งผลให้แคลลัสไม่มีชีวิตรอด

6. อะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 มีความเหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัสมังคุดมากที่สุด ให้เปอร์เซ็นต์โนดูลาแคลลัสรอดชีวิต 2.5

เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 โนดูลาแคลลัสไม่มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมที่สุด คือ 24 ชั่วโมง ส่วนระยะเวลาเลี้ยงร่วมที่ 36 และ 48 ชั่วโมง โนดูลาแคลลัสไม่มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต

7. สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ $9.8x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระดับความหนาแน่นที่เหมาะสมที่สุดต่อการปลูกถ่ายยีนกับโนดูลาแคลลัส ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 25 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเฉลี่ย 15.62 เปอร์เซ็นต์

8. การใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 วินาที เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นการส่งถ่ายยีนให้กับโนดูลาแคลลัส ให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดเฉลี่ย 21.87 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดเปรียบเทียบที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อโนดูลาแคลลัสไม่มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต

เอกสารอ้างอิง

ธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2533. การขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์. 2538. การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เมฆา ชาติกุล. 2536. การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และวันทนา เอ้งย่อง. 2531. การขยายพันธุ์มังคุดจำนวนมากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. สงขลานครินทร์ 10:7-11.

สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมังคุดในหลอดทดสอบเพื่อการขยายพันธุ์. ว. สงขลานครินทร์ 14:353-359.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณ์ อุดมสิน. 2537. มังคุด. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร 40:35-37.

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.

Benjamin, B. D., Roja, G. and Heble, M. R. 1993. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Rouvolfia serpentina*: Regeneration and alkaloid synthesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 253-257.

Blay, E. and Oakes, J. V. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Solanum gilo* Raddi as influenced by explant type. Plant Cell Reports 15:582-585.

Confalonicri, M., Balestrazzi, A. and Cella, R. 1997. Genetic transformation of *Populus deltoides* and *P.* x *euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48:53-61.

Cordts, J. M., Scorza, R. and Bell, R. L. 1987. Effects of carbohydrates and nitrogen on the development of anthocyanins of a red leaf peach (*Prunus persica* L. Batsch) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 9:103-110.

Fillippone, E. and Lurquin, P. E. 1989. Stable transformation of egg plant (*Solanum melongena* L.) by cocultivation of tissue with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector. Plant Cell Reports 8:370-373.

Gama, M. I. C. S., Leite Jr, R. P., Cordeiro, A. R. and Cantliffe, D. 1996. Transgenic sweet potato plant obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell,Tissue and Organ Culture 46:237:244.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirement for suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.

Goh, C. J., Lakshmanan, P. and Loh, C. S. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Plant Science 101:173-180.

Goh, H. K. L., Rao, A. N. and Loh, C. S. 1988. *In vitro* plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Annals of Botany 62:87-93.

Hayman, G. T., Von-Bodman, S. B., Kim, H., Jiang, P. and Farraand, S.K. 1993. Genetic analysis of the agrocinopine catabolic region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 which encodes genes required for opine and agrocin 84 transport. J. Bacteriol. 175:5575-5584.

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.

Karthikeyan, A. S., Sarma, K. S. and Veluthambi, K. 1996 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Vigna mungo* Hepper. Plant Cell Reports 15:328-331.

Korban, S.S., Connor, P. A., and Elobeidy, A. 1992. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. Journal of Horticultural Science 67:341-349.

Kosuge, T., Meredth, C. P. and Hollaender, A. 1982. Genetic Engineering of Plants, An Agricultural Perspective. New York : Plenum Press

Lim, A.T. 1984. The embryology of *Garcinia mangostana* L.(Clusiaceae). The Garden's Bulletin, Singapore 37:93-103.

Lin, J.J., Assad, G. N., Kuo, J. 1994. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. Focus 16:72-77.

Lowe, J. M., Davey, M. R., Power, J. B. and Blundy, K. S. 1993. A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33:171-180.

McAfee, B. J., Lapp, M. S., Pelcher, L. E. and White, E. E. 1993. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:53-62.

McCown, B. H. and Lloyd, G. 1981. Woody plant medium (WPM) - A mineral formulation for microculture of woody plant species. HortScience 16:453.

Mok, M. C., Mok, S.W., Armstrong, D. J., Shudo, K.,Isogai, Y. and Okamoto, T. 1982. Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N*-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). Phytochemistry 21:1509-1511.

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.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:473-497.

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

Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., Destefano-Beltran, L. and Jeynes, L. M. 1994. Transgenic Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica 77:123-128.

Normah, M .N., Nor-Azza, A. B., Aliudin, R. 1995. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43:291-294.

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

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

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

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

Stephen, L. S., Kwabena, K. O. and Douglas, B. F. 1994. Genetic transformation of cocoa leaf cell using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37:243-251.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995a. Embryogenic callus induction in mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:119-120.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995b. Plantlet formation from leaf-derived embryogenic callus of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:129-135.

Te-chato, S., Lim, M. and Suranilpong, P. 1995c. Types of medium and cytokinins in relation with purple leaf and callus formation of mangosteen. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17:121-127.

White, F. F. and Nester, E. W. 1980. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. Journal of Bacteriology 144:710-720.

Yaacob, O. and Tindall, H. D. 1995. Mangosteen Cultivation. Rome : FAO Plant Production and Protection Division.

ภาคผนวก

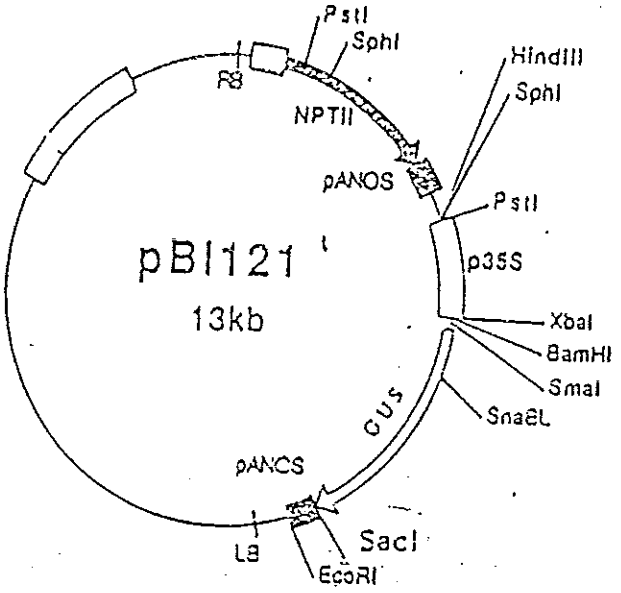
ภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงมังคุด

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	WPM
1. ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.00	400.00
KNO_3	1,900.00	-
KH_2PO_4	170.00	170.00
$Ca(NO_3)_24H_2O$	-	556.00
$CaCl_22H_2O$	440.00	96.00
$MgSO_47H_2O$	370.00	-
K_2SO_4	-	990.00
2. ธาตุอาหารรอง		
KI	0.83	-
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4H_2O$	16.90	16.90
$ZnSO_47H_2O$	10.60	8.60
$CuSO_45H_2O$	0.025	6.25
$Na_2MoO_42H_2O$	0.25	0.25
$CoCl_26H_2O$	0.025	-
3. ธาตุเหล็ก		
$FeSO_47H_2O$	27.80	27.80
Na_2EDTA	37.30	37.30
4. สารอินทรีย์		
Myo-inositol	100.00	104.10
Nicotinic acid	0.50	0.50

ภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	MS	WPM
PyridoxineHCl	0.50	0.50
ThiamineHCl	0.10	6.00
Glycine	2.00	2.00
Sucrose	30,000.00	30,000.00
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต		
ชักนำแคลลัส BA	0.50	-
TDZ	0.50	-
ชักนำยอด BA	-	0.10
6. สารประกอบอื่น ๆ		
PVP	500.00	500.00
Phytagel	1,500.00	2,500.00

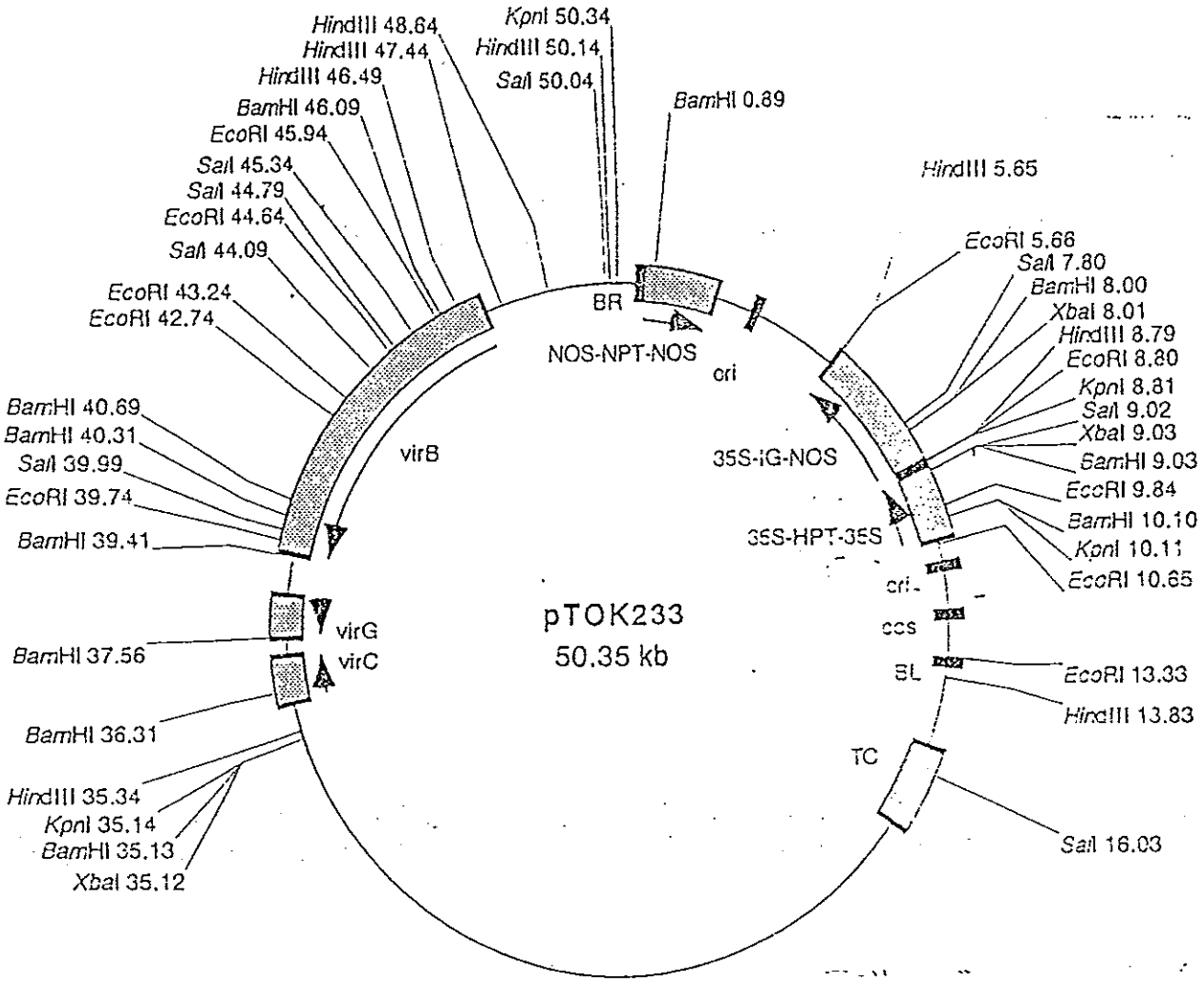
ภาคผนวกที่ 2 โครงสร้างของพลาสมิด pBI 121



ภาคผนวกที่ 3 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 4 โครงสร้างของพลาสมิด pTok 233



ภาคผนวกที่ 5. องค์ประกอบของสูตรอาหาร 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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ เริ่มอรุณ รักเผือก

วัน เดือน ปี เกิด 12 ธันวาคม 2509

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)	สถาบันราชภัฏสงขลา	2537