การศึกษาการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.)

A Study on Gene Transformation of Mangosteen Leaves with Agrobacteria (*Agrobacterium* spp.)

วิทูล ไชยภักดี

Witool Chaiparkdee

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QK495.G87 C64 2541 ฉ.2

Bib Key 144137

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.)

ผู้เขียน นายวิทูล ไชยภักดี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)	(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)	(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมิตรา วิสุทธารมณ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* spp.)
ผู้เขียน	นายวิทูล ไชยภักดี
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนในมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ขั้นต้นเป็นการศึกษาผลของการสร้างแผลให้กับแผ่นใบ ชนิดและความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (ซีโฟทาซิม และคานามัยซิน) ต่อการสร้างแคลลัส และ การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ในการศึกษาความสามารถในการปลูกถ่ายยีนนั้นเป็นการทดสอบชิ้นส่วนต่างๆ ของมังคุด สายเชื้อและความหนาแน่นของอะโกรแบคทีเรีย และวิธีการเลี้ยงร่วมเพื่อความเหมาะสมในการปลูกถ่ายยีน จากการศึกษาพบว่าการสร้างแผลโดยการแบ่งใบออกเป็นสองส่วนให้การสร้างแคลลัสสูงที่สุด 94 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการสร้างแผลโดยวิธีอื่นๆ แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นปมเกาะกันแน่น การเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นในช่วง 50 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลชักนำแคลลัสและตายอดได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามซีโฟทาซิมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีการสร้างตายอดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวเหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อส่วนเกินภายหลังการเลี้ยงร่วม ระหว่างสายเชื้อต่างๆ ของอะโกรแบคทีเรียที่ทดสอบพบว่า *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ให้แคลลัสที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินสูงที่สุด คานามัยซินเข้มข้น 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน การเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อสูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ความสามารถในการปลูกถ่ายยีนสูงขึ้น สำหรับวิธีการเลี้ยงร่วมนั้นพบว่า การจุ่มชิ้นส่วนพืชในสารละลายอะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารที่ใช้เลี้ยงร่วมซึ่งปราศจากสารปฏิชีวนะต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุด ชิ้นส่วนที่เลี้ยงร่วมแล้วให้ผลการปลูกถ่ายยีนได้ดีที่สุดคือ แผ่นใบที่ตัดแบ่งเป็นสองส่วน แม้ว่าชิ้นส่วนนี้ได้รับการปลูกถ่ายยีนได้ดีที่สุดก็ตาม แต่ความสามารถในการเพิ่มปริมาณแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่ำกว่าชิ้นส่วนแผ่นใบทั้งใบ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบเนื้อเยื่อเคมีของชิ้นส่วนที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนด้วย อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์กลูเคอโรนิเดส (GUS) ได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนจึงใช้ความต้านทานต่อคานามัยซินเพียงอย่างเดียว ตายอดขนาดเล็กได้รับการชักนำจากแคลลัสที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนบนอาหารชักนำ

การสร้างพืชต้นใหม่ หลังจากย้ายเลี้ยงไปในอาหารใหม่สูตรเดิม 2-3 ครั้ง (2-3 เดือน) ตายอด เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่ได้ต้นมังคุดจำลองพันธุ์

Thesis Title	A Study on Gene Transformation of Mangosteen Leaves with Agrobacteria (*Agrobacterium* spp.)
Author	Mr. Witool Chaiparkdee
Major Program	Plant Science
Academic Year	1997

Abstract

In this study, various factors affecting gene transformation were investigated in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Wounding of leaf explants, kinds and concentrations of some antibiotics (cefotaxime and kanamycin) were preliminary studied to optimize callus subsequently plantlet regeneration. In the case of transformation experiment, various types of explants, strains and densities of agrobacteria and co-culture methods were carried out to optimize gene transformation. The results showed that wounding the leaves by dividing into half provided the greatest callus formation of 94 %, significantly greater than the others. The callus developed from the wound site at mid rib and proximal end more than the other sites. Obtaining callus was classified as compact callus. Addition of cefotaxime at concentration ranging from 50 to 200 mg/l. produced a non-significant result in callus and direct shoot bud induction. However, 50 mg/l. cefotaxime promoted a slight increase in direct shoot bud formation. This concentration was suitable for decontamination of excess agrobacteria after co-culture. Among strains of agrobacteria tested *Agrobacterium tumefaciens*, LBA 4404 containing pBI 121, gave the greatest calli resistant to kanamycin. Kanamycin at concentration 50-100 mg/l. was the best for selection transformants. A high density of agrobacteria tended to promote a high frequency of transformation. In the case of co-culture method, dipping the explant in a solution of agrobacteria for 10 minutes, followed by culturing onto co-culture medium without any antibiotic for further 48 hours, was proved to be the best. Among explants used to co-culture with bacteria, half leaf treatment gave the best result for transformation. Although half leaf treatment gave the better result than that of whole leaf, However for callus proliferation and plantlet regeneration was inferior to whole leaf treatment.

In this investigation, a histochemical study was also carried out. Unfortunately, the activity of β-glucuronidase was not found. Accordingly, resistant to kanamycin was the only method used for detecting transformability. Shoot primordia could be induced from kanamycin resistant calli in regeneration medium. After maintenance by subculturing to the same medium for 2 to 3 times (2-3 months) the developed shoots turned brown and finally died, so that transformation of mangosteen was not obtained from this experiment.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ความกรุณาประสิทธิประสาทวิชาให้คำปรึกษาแนะนำในการเรียนการเขียน การศึกษาวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมิตรา วิสุทธารมณ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี กรรมการสอบที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้ความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้โอกาสการศึกษา และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานีที่ให้ทุนสนับสนุนการเรียน

สุดท้ายผู้เขียนขอน้อมระลึกถึง พระคุณของ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ทุกท่าน ตลอดจนสถาบันการศึกษาทุกแห่งที่ได้ให้การศึกษาประสิทธิประสาทวิชาความรู้ อบรมสั่งสอน และขอขอบคุณ พี่ และน้อง ตลอดจนเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ในการทำวิจัยและการศึกษาตลอดจนสำเร็จการศึกษา

วิทูล ไชยภักดี

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	11
2. วิธีการวิจัย	12
วัสดุ อุปกรณ์	12
วิธีดำเนินการ	17
3. ผล	24
4. วิจารณ์	53
5. สรุป	62
เอกสารอ้างอิง	64
ภาคผนวก	70
ประวัติผู้เขียน	74

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ผลของวิธีการสร้างแผลกับใบมังคุดต่อการชักนำแคลลัส 25
2. ผลของวิธีการสร้างแผลกับใบมังคุดต่อการสร้างแคลลัส 27
3. ผลของซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างแคลลัสของใบมังคุดบนอาหาร MS เติม BA และ TDZ เท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 30
4. ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการสร้างยอดจากใบมังคุดบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 32
5. เปอร์เซ็นต์แคลลัสจากการเลี้ยงใบมังคุดร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) ต่อการปลูกถ่ายยีนบนอาหารเติมคานามัยซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 35
6. เปอร์เซ็นต์แคลลัสหลังการเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน 39
7. ผลของสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน (วัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย) 42
8. ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมต่อการปลูกถ่ายยีน (วัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย) 46
9. ผลของวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัส 48
10. ผลของสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซิน 52

รายการรูป

รูปที่	หน้าที่
1. การสร้างแผลกับแผ่นใบแบบต่าง ๆ	18
2. ผลของวิธีการสร้างแผลกับใบมังคุดต่อการชักนำแคลลัส	26
3. แคลลัสจากการสร้างแผลกับใบมังคุดโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง	28
4. แคลลัสจากการสร้างแผลกับใบมังคุดโดยตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวาง	28
5. ผลของซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างแคลลัสจากใบมังคุดบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	30
6. ผลของซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างกลุ่มตารวมและยอดบนอาหาร MS เติม BA และ TDZ เท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	31
7. ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการสร้างยอดโดยตรงบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน	31
8. ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆต่อความสามารถในการสร้างยอดจากใบมังคุดบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	32
9. ลักษณะของจุดกำเนิดยอด (ศรชี้) คล้ายการสร้างแคลลัส บนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	33
10. ลักษณะของการสร้างยอดโดยตรงจากใบบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	33
11. แสดงเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่สามารถต้านทานต่อคานามัยซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	36
12. แคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดเป็นเวลา 3 เดือน โดยอาศัยยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินบนพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก	37
13. แคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดเป็นเวลา 3 เดือน โดยอาศัยยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินบนพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก	40
14. กลุ่มตารวมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อวางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน (A) และที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ LBA 4404 ที่มี pBI 121 (B)	40
15. ผลของสายเชื้อที่ความหนาแน่น 1.98×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อ ความสามารถในการปลูกถ่ายยีนวัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย	43

16. แสดงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายเชื้อกับระดับความหนาแน่นของเชื้อ 44
17. ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมต่อการปลูกถ่ายยีนวัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย 46
18. ผลของวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัส 49
19. ผลของวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัส 50

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA/BAP	=	benzyladenine/ benzylaminopurine
DMRT	=	Duncan's 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	=	transferred 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.) อยู่ในวงศ์ Guttiferae (เต็ม สมิตินันทน์, 2523) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญพืชหนึ่งซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนชื้น แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันมากในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และพม่า (Yaacob and Tindall, 1995) สำหรับประเทศไทยปลูกกันมากทางภาคใต้ และ ภาคตะวันออก ผลผลิตที่ได้นอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้วยังส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศเช่น อังกฤษ เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ ฮ่องกง สิงคโปร์ และ ญี่ปุ่น (อารมณ์ อุดมสิน, 2537) มังคุดที่ปลูกในปัจจุบันมีเพียงพันธุ์เดียวคือ พันธุ์พื้นเมือง การปลูกมังคุดนิยมใช้วิธีการเพาะเมล็ดพันธุ์ เมล็ดพันธุ์มังคุดพัฒนาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัสโดยไม่ได้รับการผสมพันธุ์ ทำให้ไม่มีการกลายพันธุ์ แต่การขยายพันธุ์มังคุดด้วยเมล็ดพันธุ์มีข้อจำกัดคือ จำนวนเมล็ดพันธุ์ของมังคุดมีน้อยเพียง 0 - 2 เมล็ดต่อผล เมล็ดพันธุ์จัดอยู่ในประเภทรีคาลซิแทรน (recalcitrant seed) ซึ่งสูญเสียความงอกเร็วเมื่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ลดลง ทำให้เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ได้ไม่นาน ต้นกล้ามังคุดที่ได้จากการเพาะเมล็ดพันธุ์มีการเจริญเติบโตช้า แม้ว่าการปลูกด้วยเมล็ดพันธุ์จะไม่มีการกลายพันธุ์ก็ตามแต่ลักษณะความแตกต่างที่พบเช่น ขนาดของผล ขั้วผล ใบ สีของเปลือกผล นั้นมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมที่ปลูกแตกต่างกัน เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ลักษณะดิน อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน (Yaacob and Tindall, 1995) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์มังคุดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การชักนำยอดโดยตรงจากใบ (Goh *et al.*, 1988; Goh *et al.*, 1994) และโดยผ่านเมอริสเต็มโนดูลแคลลัสจากใบ ก้านใบ และเมล็ดพันธุ์ (Te-chato *et al.*, 1995a) เพื่อเพิ่มปริมาณต้นกล้าที่ใช้ปลูกให้ได้เพียงพอต่อความต้องการ และใช้เป็นแหล่งวัสดุพืชในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองร่วมกับการใช้รังสี สารเคมี รวมทั้งการใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่มังคุด

การขยายพันธุ์มังคุดในหลอดทดลองเป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จวิธีหนึ่งในการเพิ่มปริมาณ ของต้นกล้า แต่ปัจจุบันมักมีปัญหาเกี่ยวกับระบบการสร้างราก ถึงแม้มีการชักนำการสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์แล้วก็ตามแต่ปริมาณรากมีน้อย ทำให้ความแข็งแรงของต้นลดลงเมื่อนำไปปลูกในแปลง การใช้อะโกรแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินที่สามารถส่งข้อมูลทางพันธุกรรมเข้าสู่พืชได้ทางบาดแผลอาจแก้ปัญหาข้างต้นได้ อะโกรแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ *Agrobacterium tumefaciens* และ *Agrobacterium rhizogenes* สำหรับอะโกรแบคทีเรีย

ชนิดแรก มี Ti plasmid (tumour inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้างปมในพืช ส่วน *Agrobacterium rhizogenes* มี Ri plasmid (root inducing plasmid) ซึ่งส่งเสริมการสร้างรากลอยในพืช (Kosuge *et al.*, 1982) ปัจจุบันนิยมใช้อะโกรแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด เป็นตัวกลางในการนำยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าสู่พืชเพื่อปรับปรุงพันธุ์ได้หลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล (Petena *et al.*, 1988) เฮเซลนัท (Bassil *et al.*, 1991) ส้ม (Pena *et al.*,1995a; 1995b) เป็นต้น

การใช้อะโกรแบคทีเรียในการปลูกถ่ายยีนมังคุดเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์มังคุด เพื่อให้มีลักษณะตามความต้องการ เช่น มีระบบรากที่ดี ทนแล้ง เปลือกบาง สร้างยางน้อย เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการปลูกถ่ายยีนในมังคุดโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ก่อนที่จะมีการปลูกถ่ายยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจดังกล่าวข้างต้นควรมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการปลูกถ่ายยีนให้กับมังคุด ดังนั้นในการศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้อะโกรแบคทีเรียนำยีนสู่มังคุดโดยใช้ยีนต้านทานต่อคานามัยซินและยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase (GUS) เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ

การตรวจเอกสาร

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศสามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละประมาณ 40 - 50 ล้านบาท มีพื้นที่ปลูกทั่วประเทศรวม 150,983 ไร่ ผลผลิต 90,263 ตัน (อารมณ์ อุดมสิน, 2537) มังคุดเป็นไม้ผลยืนต้นที่มีการเจริญเติบโตช้า มีอายุยืน ต้นที่เจริญจากเมล็ดพันธุ์ตามธรรมชาติเริ่มให้ผลผลิตเมื่อมีอายุ 6 ปี และให้ผลผลิตเต็มที่ในปีที่ 10-15 ต้นมีความสูงประมาณ 6-25 เมตร ลำต้นตั้งตรงเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25-35 เซนติเมตร มีทรงพุ่มเป็นแบบปิรามิดกว้าง 9-12 เมตร มีการแตกกิ่งออกจากลำต้นเป็นรัศมีรอบลำต้นเท่ากันทุกด้าน เปลือกของลำต้นมีสีน้ำตาลเข้ม มียางสีเหลือง (Yaacob and Tindall, 1995) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์อื่นๆ ประกอบด้วย ใบเป็นใบเดี่ยว เกิดเป็นคู่ตรงข้าม (opposite) หนา กว้างประมาณ 3-7 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร หลังใบมีสีเหลืองปนเขียว ขอบใบทั้งสองด้านยกขึ้น ไม่ผลัดใบ ดอกมังคุดเกิดบริเวณปลายกิ่ง มีทั้งดอกตัวผู้และดอกกะเทยในต้นเดียวกัน (polygamous) แต่ที่พบส่วนใหญ่เป็นดอกกะเทย (สุรชัย มัจฉาชีพ, 2528) ดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบ เกสรตัวผู้เป็นหมันอยู่ล้อมรอบรังไข่ประมาณ 14-16 อัน รังไข่อยู่บนฐานรองดอก มีห้องภายในรังไข่ (carpel) 4-7 ห้อง รังไข่อยู่สูงกว่าเกสรตัวผู้ (hypogynous) เกสรตัวเมียไม่มีก้านชูมีลักษณะเป็นแฉกติดกับรังไข่ ดอกมังคุดบานเวลาประมาณ 16.00-18.00 น หลังจากดอกบาน 24 ชั่วโมง กลีบดอกจะร่วง (Lim, 1984) และเริ่มมีการพัฒนาการของผลอ่อน ผลเป็นแบบฉ่ำน้ำ (berry) เมื่อสุกเต็มที่มีสีม่วง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-7 เซนติเมตร เปลือกหนา 0.7-1.0 เซนติเมตร เนื้อผลเกิดจากเยื่อหุ้มไข่อ่อน (integument) ส่วนเมล็ดพันธุ์มังคุดพัฒนามาจากนิวเซลลัสซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ ถุงคัพภะ (embryo sac) ที่เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงต้นอ่อน เมล็ดพันธุ์สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่า 1 ต้น (มงคล แซ่หลิม, 2531) รากที่งอกมีการเจริญและพัฒนาการช้า เปราะบาง และได้รับความเสียหายได้ง่ายจำเป็นต้องมีความระมัดระวัง ต้นที่มีความสูงประมาณ 3-8 เมตร พบว่ามีรากกระจายอยู่รอบทรงพุ่มเป็นบริเวณกว้าง ประมาณ 2-5 เมตร ความลึกของรากอาจมากกว่า 1 เมตร อย่างไรก็ตามรากมังคุดสามารถพัฒนาได้ดีบริเวณความลึก 5-30 เซนติเมตร (Yaacob and Tindall, 1995)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูกมังคุด

มังคุดสามารถเจริญได้ดีตั้งแต่ดินเหนียวถึงดินร่วนปนทรายมีความอุดมสมบูรณ์ ระบายน้ำได้ดี ความเป็นกรดด่างประมาณ 5.5 นิยมใช้ระยะปลูกตั้งแต่ 8-10 x 8-10 เมตร ปริมาณน้ำฝนมากกว่า 100 มิลลิเมตรต่อปี หากปริมาณฝนต่ำกว่า 60 มิลลิเมตร เป็นเวลา 2 เดือน อาจทำให้ตายได้ อุณหภูมิที่เหมาะสม 25 - 35องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิต่ำหรือกระทบความหนาวจะทำให้การออกดอกชะงัก มังคุดเป็นพืชในเขตร้อนชื้น ชอบความชื้นสูง ฝนตกชุก ยกเว้นช่วงฤดูกาลก่อนการออกดอกพบว่าการขาดน้ำเป็นตัวช่วยกระตุ้น การออกดอกได้ ชอบเจริญร่วมอยู่กับพืชชนิดอื่นๆ เนื่องจากเป็นพืชที่ต้องการร่มเงาในช่วง 4 - 5 ปีแรกของการเจริญเติบโต (Yaacob and Tindall, 1995)

การขยายพันธุ์มังคุด

การขยายพันธุ์นอกหลอดทดลอง สามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือ การเพาะเมล็ดพันธุ์และการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ การขยายพันธุ์ด้วยวิธีแรกทำโดยคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีขนาดโต ล้างทำความสะอาดโดยแยกเนื้อผลออก แล้วนำไปเพาะในแปลงเพาะซึ่งมีอินทรีย์วัตถุสูง คลุมด้วยวัสดุคลุมอีกชั้นเพื่อควบคุมความชื้น ให้น้ำสม่ำเสมอประมาณ 20 - 30 วัน เมล็ดพันธุ์ก็จะงอก เมื่อต้นกล้ามีใบอ่อน 2 ใบ ย้ายลงชำในถุงพลาสติก (นิวัฒน์ พรหมแพทย์, 2532) ส่วนการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศทำได้โดย การเสียบยอด การทาบกิ่ง การตอน การติดตา มงคล แซ่หลิม (2531) รายงานว่าการเสียบยอดและทาบกิ่งมังคุดนอกจากใช้มังคุดเป็นต้นตอแล้ว พืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันที่ประสบผลสำเร็จรองลงมาคือ พะวา (*Garcinia speciosa*) และ มะพูด (*G. dulcis*) การเตรียมกิ่งพันธุ์ดีควรเป็นกิ่งที่มีอายุ ขนาดใกล้เคียงกับต้นตอ กิ่งตั้งตรง มีตาโผล่เล็กน้อย Yaacob และ Tindall (1995) พบว่าการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเสียบยอดแบบเสียบลิ่มเป็นที่นิยมและให้ผลสำเร็จสูง สำหรับการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการตอน การปักชำ เป็นวิธีที่ให้ผลสำเร็จน้อยมาก เนื่องจากมีข้อจำกัดการออกรากยากและน้อย แม้ว่าจะมีการใช้สารเคมีส่งเสริมการสร้างรากช่วย

การขยายพันธุ์มังคุดด้วยวิธีการไม่อาศัยเพศอีกวิธีหนึ่งในหลอดทดลอง สามารถทำได้คือการเพาะเมล็ดพันธุ์ในอาหารสูตรพื้นฐานและดัดแปลง MS (Murashige and Skoog, 1962) ส่วนการเพาะเลี้ยงใบอ่อน สามารถชักนำได้ 2 ช่องทางด้วยกันคือ การชักนำยอดโดยตรง และการชักนำพืชต้นใหม่โดยผ่านเมอริสเต็มโนดูลแคลลัส ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น การเตรียมใบ สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น (Te-chato *et al.*, 1995a)

Goh และคณะ (1988) ศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่โดยตรง จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงมังคุดบนอาหาร 3 สูตร คือ สูตร MS ดัดแปลงโดยการลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ (1/2 MS) ยกเว้นน้ำตาลซูโครสซึ่งยังใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ สูตร WPM (woody plant medium) (McCown and Lloyd, 1981) และสูตร B5 (Gamborg *et al.*, 1968) พบว่าอาหารสูตร WPM มีประสิทธิภาพในการชักนำยอดได้สูงสุด ส่วนการใช้ใบที่มีอายุต่างกัน คือ 7 - 9 วัน, 10 - 12 วัน, 13 - 15 วัน และ 16 - 18 วัน และมีการเตรียมต่างกันคือ เพาะเลี้ยงทั้งใบ ตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน 3 ส่วน และ 4 ส่วน พบว่าอายุ 7-9 วัน ที่มีการตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดได้สูงสุด หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ยอดพัฒนาจากบริเวณโคนใบมากกว่าปลายใบ และ บริเวณเส้นกลางใบมากกว่าแผ่นใบ สำหรับใบที่ไม่มีการตัดแบ่ง และใบที่มีอายุสูงกว่า 12 วัน ไม่พบการสร้างยอด อัตราการสร้างยอดลดลงเมื่อมีการตัดแบ่งมากกว่า 2 ส่วน และจากการศึกษาการชักนำรากมังคุดในอาหารสูตร MS เติม IBA (indolebutyric acid) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำรากได้ 7 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA เป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถสร้างรากได้ 24 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 1 สัปดาห์

ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2533) รายงานการเพาะเลี้ยงใบมังคุดบนอาหาร 2 สูตร คือ MS และ WPM พบว่าใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถชักนำการสร้างยอดได้ส่วนอาหารสูตร MS ไม่มีผลต่อการสร้างยอด สำหรับชนิดของใบที่มีผลต่อการชักนำพืชต้นใหม่โดยตรงนั้นพบว่า ใบอ่อนสีแดงที่ได้จากต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีอายุประมาณ 3 - 4 เดือน ที่กรีดผ่านเส้นกลางใบเท่านั้นที่ประสบผลสำเร็จ ส่วนใบสีเขียวไม่สามารถสร้างยอดได้ พัฒนาการของยอดเกิดบริเวณรอยกรีดตรงเส้นกลางใบโดยระยะแรกมีลักษณะเป็นตุ่มกลมสีเขียว หลังจากเลี้ยงต่อมาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตุ่มสีเขียวพัฒนาไปเป็นยอดที่สมบูรณ์ ยอดเกิดบริเวณเส้นกลางใบค่อนมาทางโคนใบมากกว่าปลายใบและไม่พบยอดตรงบริเวณแผ่นใบ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของ BA (benzyladenine) ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 20, 50, 70 และ 100 ไมโครโมลาร์ ต่อการชักนำยอดโดยตรงจากใบ พบว่า BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดจากใบอ่อนสีแดงและความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด ส่วนความเข้มข้น 100ไมโครโมลาร์ไม่สามารถชักนำการสร้างยอดได้

Goh และคณะ (1994) ศึกษาผลของ BA เข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ เพียงอย่างเดียวหรือร่วมด้วย IAA (indoleacetic acid) ต่อการชักนำยอดโดยตรงจากใบมังคุดที่ตัดแบ่งให้มีขนาด 3 มิลลิเมตร พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ชักนำการสร้างตายอดมากกว่าความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ 5.4 เท่า และเมื่อเติม IAA ร่วมกับ BA ทำให้ความสามารถสร้างตายอด และการยืดยาวของยอดลดลง

Te-chato และคณะ (1995a) รายงานว่าอาหารแข็งสูตร MS เหมาะสมต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนสีแดง ส่วนอาหารแข็งสูตร WPM มีประสิทธิภาพต่อการสร้างตายอดจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงกว่าอาหารแข็งสูตร MS และจากการศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่โดยผ่านการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ พบว่าใบอ่อนสีแดงให้เปอร์เซ็นต์การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและจำนวนเอ็มบริออยด์สูงสุด รองลงมาเป็นใบสีเขียว ก้านใบและชิ้นส่วนเมล็ดตามลำดับ ชิ้นส่วนใบอ่อนสีแดงขนาด 5-15 มิลลิเมตร สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบที่มีขนาด 15-40 มิลลิเมตร

Te-chato และคณะ (1995c) ศึกษาชนิดของไซโตไคนินที่มีผลต่อการชักนำใบอ่อนสีแดงจากยอดรวมในหลอดทดลองและชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนสีแดงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS เติม NAA (1-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA หรือ TDZ (thidiazuron) ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ มีผลต่อการชักนำใบอ่อนสีแดงจากยอดรวมในหลอดทดลองได้ดีที่สุด ในกรณีการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อนสีแดง พบว่าการใช้ NAA ร่วมกับ BA และ TDZ ให้เปอร์เซ็นต์สูงสุด ในขณะที่การใช้ BA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบได้ แม้ว่า NAA ร่วมด้วย BA และ TDZ ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงก็ตาม แต่จำนวนแคลลัสต่อชิ้นส่วนน้อยกว่าการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว การเติม NAA ลงในอาหารชักนำแคลลัสมีผลทำให้แคลลัสเป็นสีน้ำตาล จากรายงานข้างต้นจึงใช้ BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปราศจาก NAA พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หลังจากมีการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้างยอด (shoot primodia) และส่งเสริมการยืดยาวของยอด เพื่อชักนำรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป

Te-chato และคณะ (1995b) ศึกษาการชักนำรากมังคุด โดยตัดยอดที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ทำบาดแผลบริเวณฐานยอดจุ่มแช่ในสารละลาย IBA 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืดเป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายเลี้ยงชักนำการสร้างรากบนอาหารแข็งสูตร WPM ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมผงถ่าน 0.025 เปอร์เซ็นต์ และ PG (phluroglucinol) ระดับความเข้มข้นต่าง ๆในสภาพมืด 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงใน

ที่มีแสง 2,000 ลักซ์ เวลา 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ พบว่าชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ PG และ PG ระดับความเข้มข้น 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด

การศึกษาเกี่ยวกับอะโกรแบคทีเรีย

อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืชพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่อาศัยอยู่ในดินสร้างความเสียหายให้กับพืชใบเลี้ยงคู่ โดยทำให้เกิดโรคปุ่มปมบริเวณบาดแผลที่เข้าทำลาย ปุ่มปมที่สร้างเป็นผลมาจากเซลล์พืชบริเวณดังกล่าวมีอัตราการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (Garfinkel and Nester, 1980) และ พบว่าเนื้อเยื่อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ได้โดยปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และสามารถสังเคราะห์สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน คือโอไพน์โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช สารดังกล่าวใช้เป็นแหล่งพลังงาน (คาร์บอนและไนโตรเจน) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การเกิดโรคปุ่มปมพบว่าเกิดจาก DNA บางส่วนบน Ti plasmid (tumour inducing plasmid) คือ T-DNA (transferred DNA) ของอะโกรแบคทีเรียมีการถ่ายทอดเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช (Kosuge *et al.*, 1982) ต่อมาจึงได้พยายามนำส่วนของ T-DNA มาใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืช เช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนทนแล้ง ยีนที่ยั้บยั้งการสังเคราะห์เอทธีลีน เป็นต้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536) จากการค้นพบ Ti plasmid และได้มีการศึกษาถึงบทบาท กลไกต่างๆ ในการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ต้นพืชพบว่า Ti plasmid มีอยู่ 2 ชนิดตามโอไพน์ที่สร้างขึ้น คือ พลาสมิดชนิดออคโทไพน์ มียีนที่ควบคุมการสร้างออคโทไพน์ (*ocs*) อะโกรไพน์ (*agr*) และ พลาสมิดชนิดโนพาไลน์ มียีนที่ควบคุมการสร้างโนพาไลน์ (*nos*) และ อะโกรซิโนไพน์ (*acs*) จากการวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot hybridization พบว่า Ti plasmid มีส่วนประกอบของ T-DNA ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ซึ่งเป็นส่วนที่มีการถ่ายทอดเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชแล้วควบคุมการสร้างโอไพน์ตามชนิดของ Ti plasmid และ อีกส่วนหนึ่งคือ virulent gene (*vir*) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช สำหรับส่วนอื่นเป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุล T-DNA ที่ส่งถ่ายไปยังพืชเกิดการรวมอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536) การเคลื่อนย้ายของ T-DNA ถูกกำหนดขอบเขตโดยลำดับเบสที่ซ้ำกัน 2 ข้าง คือ left border (LB) และ right border (RB) ข้างละประมาณ 25 คู่เบส (Alt *et al.*, 1990) นอกจากนี้กลไกการเคลื่อนย้าย T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียไปยังพืชอาศัยควบคุมโดยกลุ่ม *vir* gene บน Ti plasmid กลุ่มยีนเหล่านี้ประกอบด้วยยีนที่มีหน้าที่ต่างๆ เช่น ยีน *vir* A มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการจดจำสารประกอบฟีนอล acetosyringone (สารที่พืชสร้างขึ้นป้องกันการเข้าทำลาย

ของเชื้อโรคเมื่อเกิดบาดแผล) ยีน *vir* D ควบคุมการสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ T-DNA ตรงตำแหน่ง RB และ LB ให้ T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) พร้อมส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชโดยเริ่มจากปลายด้าน RB ไปเรื่อยๆ เพราะฉะนั้น RB จึงเป็นส่วนที่จำเป็นมากในการส่งถ่าย T-DNA ส่วนปลายด้าน LB ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดความยาวของ T-DNA แม้จะไม่มีส่วนของ LB หรือ มีแต่ขาดหายไปบางส่วน การส่ง T-strand ก็เกิดขึ้นได้แต่ขนาดของ T-DNA ไม่แน่นอน เพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายเกิดขึ้นแบบสุ่ม เมื่อ T-DNA เข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชจึงมีการแสดงออกของยีนที่อยู่บนส่วนของ T-DNA (Alt *et al.*, 1990; Steck *et al.*, 1990) Mathews และคณะ (1990) ได้ศึกษาการส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ C58 และ C1 ใน *Atropa belladona* ภายใต้การใช้ acetosyringone เติมในอาหารที่เลี้ยง พบว่าสามารถปลูกถ่ายยีนได้ 72 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่ใช้ acetosyringone ได้ผลเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของ T-DNA นอกจากจะมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์สารโอไพน์แล้วยังมียีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซิน และไซโตไคนินอยู่ด้วย ทำให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มปมที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก (Sitbon *et al.*, 1993) ยีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่พบ คือ tryptophan monooxygenase (*tms*1), indoleacetamide hydrolase (*tms* 2) และ isopentenyl transferase (*tmr*) ยีน 2 ยีนแรกเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสาร tryptophan ไปเป็น indole-3-acetic acid ซึ่งเป็นฮอร์โมนกลุ่มออกซินส่วนยีน *tmr* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง isopentenyl adenosine ซึ่งเป็นฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน หากยีน *tms* เกิดการกลายพันธุ์ (ขาดหาย) จะทำให้เนื้อเยื่อปุ่มปมนั้นเกิดการพัฒนาเป็นยอด (tumour morphology shoot) แต่ถ้ายีน *tmr* เกิดการกลายพันธุ์ (ขาดหาย) เนื้อเยื่อนั้นจะพัฒนาไปเป็นราก (tumour morphology root) (Kingsman and Kingsman, 1988)

ในกรณีการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัย T-DNA สามารถที่จะแฝงยีนที่ต้องการไปกับ T-DNA โดยการตัดยีนที่ไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่าย T-DNA บน Ti plasmid หรือยีนอื่นๆ บน T-DNA ออกและแทนที่ด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อมีการปลูกถ่าย T-DNA เข้าสู่พืชโดยอะโกรแบคทีเรีย พืชก็จะได้รับยีนที่ตัดต่อไว้แทน ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการ

Shen และคณะ (1988) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนใน *Lotus corniculatus* ด้วย *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ 15834 และ 8196 กับส่วนของลำต้นเพื่อชักนำการสร้างรากลอย เมื่อวิเคราะห์ส่วนของรากจากต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน พบว่ารากจากต้นดังกล่าวสามารถสังเคราะห์ออกซินได้สูงกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกถ่ายยีน 100-1000 เท่า และพบตำแหน่งของ T-DNA ที่สังเคราะห์ออกซินอยู่ในเซลล์ของรากเมื่อรากพัฒนาให้พืชต้นใหม่ พืชต้นใหม่ที่ได้จึงมีการสังเคราะห์ออกซินได้สูง

Fillippone และ Lurquin (1989) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในมะเขือยาว โดยใช้ใบเลี้ยง เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A281 ที่มีพลาสมิด pGA472 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้เซลล์แขวนลอยเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่มีค่า OD $_{550}$ 0.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกในอาหารเติมคานามัยซิน 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ใบสามารถปลูกถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือยาว ให้ต้นที่มีความต้านทานต่อคานามัยซิน ในขณะที่การใช้เซลล์แขวนลอยไม่สามารถทำการปลูกถ่ายยีนได้

Benjamin และคณะ (1993) ได้ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในระย่อม (*Rouvolfia serpentina*) โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ 15434 ที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหาร AB (White and Nester, 1980) เป็นเวลา 3 วัน ป้ายกับส่วนของตาข้างที่เพิ่งเจริญจากข้อ เพื่อศึกษาการเจริญเป็นพืชต้นใหม่และการสังเคราะห์สารอัลคาลอยด์ หลังเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเนื้อเยื่อดังกล่าวสามารถสร้างปมได้ตรงตำแหน่งที่เชื้อเข้าทำลาย มีการเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาให้รากลอยได้จำนวนมาก รากหรือยอดที่ได้จากบริเวณดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ ต้นที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนแสดงลักษณะทางสันฐานและทางสรีระแตกต่างจากต้นปกติอย่างชัดเจน เช่น ดอกมีสีอ่อนกว่า มีรากลอยมากกว่า น้ำหนักต่อต้นมีมากกว่าแต่ปริมาณอัลคาลอยด์ไม่มีความแตกต่างกัน

Lowe และคณะ (1993) ทำการศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียสายเชื้อต่างๆ และการเจริญเป็นพืชต้นใหม่ของเบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora*) พันธุ์ Super White โดยใช้ส่วนของลำต้นเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ C58#3 ที่มีพลาสมิด pFW220, สายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pCG20 ซึ่งมียีนที่ต้านทานต่อคานามัยซิน (สารปฏิชีวนะสำหรับคัดเลือก) และพลาสมิด pJIT101, pJIT119 มียีนที่ต้านทานต่อบาสตา (Basta) และ อะซูล็อกซ์ (Asulox) (สารกำจัดวัชพืชสำหรับคัดเลือก) เป็นยีนเครื่องหมาย การเตรียมเชื้อทำโดยอินคิวเบทในอาหาร LB (Maniatis *et al.*, 1982) เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง หลังเลี้ยงร่วมแล้ววางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารเฉพาะของแต่ละพลาสมิด เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (สารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกิน) ผลปรากฏว่าสายเชื้อที่ใช้มีผลต่อการสร้างแคลลัสได้ต่างกัน การใช้ยีนเครื่องหมายข้างต้นไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้ในการปลูกถ่ายยีน อย่างไรก็ตามไม่สามารถทำการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เบญจมาศได้

McAfee และคณะ (1993) ทำการชักนำรากของสน (*Pinus monticola*) และ larch (*Larix* spp.) โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A4 ที่มีพลาสมิด pRiA4b เลี้ยงร่วมกับส่วนของยอดด้วยวิธีป้ายด้วยเชื้อจำนวน 1 ลูป นำไปวางเลี้ยงใน vermiculite พบว่าจำนวนรากและคุณภาพของรากดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต และการไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ

Norelli และคณะ (1994) ทำการปลูกถ่ายยีนกับใบอ่อนที่กรีดแผ่นใบ 3-4 รอย ของแอปเปิ้ลพันธุ์ Malling 26 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pLDB15 ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้จากเชื้อ *Erwinia amylovora* อินคิวเบทในอาหารเหลวเติม acetosyringone 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังการเลี้ยงร่วมกับใบนำไปวางเลี้ยงร่วมกันบนอาหารแข็งที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อส่วนเกินในอาหารเหลวเติมซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และพอโรมัยซิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที 2 ครั้งเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนทางชีวเคมีและการเพาะเชื้อ พบว่าได้ต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนและมีความต้านทานต่อเชื้อ *Erwinia amylovora*

Stephen และคณะ (1994) ทำการปลูกถ่ายยีนในใบโกโก้ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A281 มีพลาสมิด pGPTV ความเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับใบอ่อนที่ตัดให้มีขนาด 3x10 มิลลิเมตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในอาหารที่เติม acetosyingone 100 ไมโครโมลาร์ คาร์เบนนิซิลิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ใบโกโก้ได้โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ neomycin phosphotransferase II ในแคลลัส 7 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

Pena และคณะ (1995b) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนให้มีประสิทธิภาพสูงและการสร้างพืชต้นใหม่ในส้มโดยการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 มีพลาสมิด p35SGUSINT ความหนาแน่น $4x10^7$ และ $4x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับส่วนของลำต้นที่มีความยาว 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 2 วัน นำไปวางเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และแวนโคมัยซิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อที่มีความหนาแน่น $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถปลูกถ่ายยีนได้ 20.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความหนาแน่น $4x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถปลูกถ่ายยีนได้เพียง 1 เปอร์เซ็นต์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเตรียมชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการใช้ในการปลูกถ่ายยีน
2. ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการสร้างแคลลัสและการสร้างยอดรวมจากใบมังคุด
3. เพื่อศึกษาระบบการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย
4. เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน โดยวิธีเนื้อเยื่อเคมีและอาศัยความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (คานามัยซิน) ที่เป็นยีนเครื่องหมาย
5. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์มังคุดโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการปลูกถ่าย

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุพืช

1. เมล็ดมังคุดจากผลสุก
2. ต้นมังคุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 ที่ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อคานามัยซิน และ GUS เป็นยีนรายงานผลเลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok 233 ที่ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน และ GUS เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลว AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* พันธุ์ป่า (wild type) สายเชื้อ A13 ประกอบด้วยยีนโอไพน์เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร YEB ไม่เติมสารปฏิชีวนะ

4. เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 มียีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อคานามัยซินและ GUS เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

รายละเอียดโครงสร้างของพลาสมิดแสดงในภาคผนวกที่ 4 และภาคผนวกที่ 5

อุปกรณ์

1. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง
4. เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
5. ไมโครปิเปตปรับปริมาตรได้เป็นไมโครลิตร
6. เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น จานเพาะเชื้อ ฟลาสค์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต
7. กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร
8. หม้อนึ่งความดัน

9. ตู้อบไมโครเวฟ
10. เครื่องอัลตราโซนิค
11. เครื่องมือผ่าตัด เช่น ด้ามมีด ใบมีด ปากคีบ
12. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง - 30 องศาเซลเซียส
13. เครื่องเซนติฟิวก์
14. เครื่องกรองพร้อมกระดาษกรองมิลลิพอร์
15. เครื่องดูดสูญญากาศ
16. ตู้อบฆ่าเชื้อ

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร MS สูตร MS ดัดแปลง และสูตร WPM (รายละเอียดขององค์ประกอบแสดงในภาคผนวกที่ 1)
2. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียสูตร YEB และสูตร AB (รายละเอียดขององค์ประกอบแสดงในภาคผนวกที่ 2 และ ที่ 3)
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินคือ NAA
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินคือ BA TDZ
5. สารปฏิชีวนะ คานามัยซิน ไฮโกรมัยซิน และ ซีโฟทาซิม
6. สารอื่น ๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส PVP (polyvinylpyrrolidone, MW 40000)

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

1. X-gluc
2. NaH_2PO_4
3. Na_2EDTA
4. Tritron-X 100
5. Sodium lauryl sakosine sulfate
6. β-mercaptoethanol

การเตรียมใบมังคุดเพื่อใช้ในการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์มังคุดมาแกะเนื้อผลออกล้างเมล็ดพันธุ์ให้สะอาด ฟอกเมล็ดพันธุ์ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที กำจัดเส้นใยที่เป็นกลุ่มมัดท่อน้ำท่ออาหารบนผิวเมล็ดออกจนหมด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้งเพื่อกำจัดสารฆ่าเชื้อออกจนหมด (ทำภายในตู้

ย้ายเลี้ยง) ใช้ปากคีบคีบ*เมล็ด*ไปเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลไรท์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในขวดขนาด 9 x 10 เซนติเมตร ขวดละ 30 มิลลิลิตร เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,500 - 2,800 ลักซ์ เวลา 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากต้นกล้างอกได้ 1 เดือน ตัดใบไปวางบนอาหารพื้นฐานสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้างแคลลัส หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมอีก 2 ครั้งเป็นเวลา 2 เดือน เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสต่อมาย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจลไรท์ 0.25 เปอร์เซ็นต์. ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง เติม BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้างยอดและส่งเสริมการยืดยาวของยอด ตัดใบอ่อนที่มีอายุ 10- 15 วัน ของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มาทำการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียเพื่อศึกษาการปลูกถ่ายยีน

อาหารและวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษามีอยู่ด้วยกันหลายสูตรสามารถแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมังคุด (Te-chato *et al*, 1995a; 1995c)

1.1. สูตรอาหารชักนำยอดรวมจากเมล็ด

อาหารดัดแปลงสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เจลไรท์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2. สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากใบอ่อน

อาหารแข็งและอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจลไรท์ 0.15 เปอร์เซ็นต์

1.3. สูตรอาหารชักนำจุดกำเนิดตายอด

อาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจลไรท์ 0.25 เปอร์เซ็นต์

1.4. สูตรอาหารชักนำการยืดยาวของยอด

อาหารเหลวสูตร MS ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติเติม BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.5. สูตรอาหารแข็งชักนำยอดโดยตรงจากใบ

อาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปราศจากซีโฟทาซิมหรือเติมระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

อาหารสูตร yeast extract broth (YEB) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121, *A. rhizogenes* สายเชื้อ . A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และ ไม่เติมคานามัยซิน ใช้เลี้ยง *A. rhizogenes* สายเชื้อ A13 พันธุ์ป่า

อาหารสูตร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233

3. อาหารที่ใช้เลี้ยงใบมังคุดหลังมีการปลูกถ่ายยีน

3.1. สูตรอาหารกำจัดเชื้อ

อาหารสูตร 1.2 (อาหารชักนำแคลลัส) เติมซีโฟทาซิม 50-400 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2. สูตรอาหารชักนำแคลลัสเพื่อคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน

อาหารสูตร 1.2 เติมคานามัยซิน 50 ถึง 250 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ ไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3 สูตรอาหารชักนำยอดเพื่อคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน

อาหารสูตร 1.3 (อาหารชักนำจุดกำเนิดตายอด) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารทุกสูตรปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซ็นติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นสารปฏิชีวนะฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 22 ไมครอน หลังจากนั้นเติมลงในอาหารที่กำลังอุ่นที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส

การเตรียมอะโกรแบคทีเรีย

ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pBI 121 และ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่อินคิวเบทเป็นเวลาต่างๆ ปรับให้มีความหนาแน่น 1.98×10^{10}, 9.9×10^{9} และ 4.9×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับใบเพื่อศึกษาการปลูกถ่ายยีนต่อไป

สำหรับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 ใช้จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้เลี้ยงร่วมกับใบเพื่อศึกษาการปลูกถ่ายยีนต่อไป

การเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับแผ่นใบและชิ้นส่วนของต้นอ่อนมังคุด

ใช้ใบมีดผ่าตัดตัดใบอ่อนสีแดงอายุ 10 - 15 วัน และชิ้นส่วนของต้นอ่อนมังคุดจากต้นที่เลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลาต่างๆ นำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 3.1 (อาหารชักนำแคลลัสและกำจัดเชื้อ) เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรีย จากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดเลือกสูตร 3.2 (อาหารชักนำแคลลัสและคัดเลือกหลังการปลูกถ่ายยีน) ทำการย้ายเลี้ยงทุกเดือนบนอาหารเดิม หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 จึงย้ายไปชักนำยอดบนอาหารสูตร 3.3 (อาหารชักนำจุดกำเนิดตายอดและคัดเลือกหลังปลูกถ่ายยีน) ที่เติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซิน

การตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

ตัดเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายซึ่งต้องการตรวจสอบเป็นชิ้นบางๆ ใส่ในจานหลุม (Titer plate) 3-4 ชิ้นต่อหลุม เติมส่วนผสมของสารละลาย X-gluc ลงไปในหลุมๆ ละ 250 ไมโครลิตร สารละลาย X-gluc ประกอบด้วย X-gluc เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 26 ไมโครลิตร กับ lysis buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากเติมสารละลายดังกล่าวแล้วนำไปดูดด้วยเครื่องดูดสูญญากาศเป็นเวลา 20 นาที นำชิ้นส่วนในจานหลุมไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงใช้เมทธิลแอลกอฮอล์ล้างคลอโรฟิลล์ออก 3-4 ครั้ง ตรวจสอบสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อที่เกิดจากปฏิกริยาของเอนไซม์ β-glucuronidase กับ X-gluc

วิธีดำเนินการ

1. การศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อการชักนำแคลลัส

ทำการตัดแยกใบอ่อนสีแดงจากต้นชี่งเลี้ยงในหลอดทดลองในอาหาร 2 ชั้น มาสร้างแผลแตกต่างกัน 4 แบบ (หน่วยทดลอง) ดังรูปที่ 1 คือ

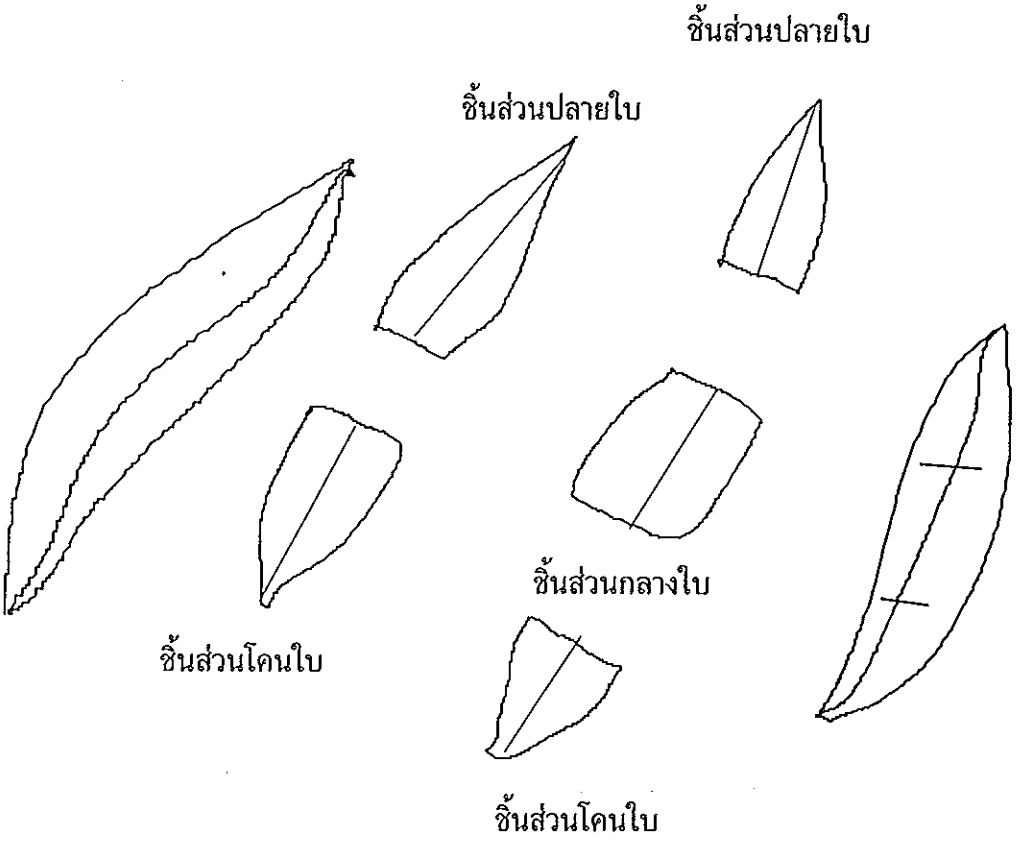
1.1. เลี้ยงทั้งใบ (whole leaf, wl.) โดยไม่มีการสร้างแผล

1.2. สร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง (half cutting, hc.)

1.3. สร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวาง (triple cutting, tc.)

1.4. สร้างแผลโดยกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-3 รอย (strip wounding, sw.)

นำใบหลังจากสร้างแผลแต่ละแบบวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 (อาหารชักนำแคลลัส) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกข้อมูลการสร้างแคลลัส เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ตำแหน่ง และลักษณะของแคลลัส ทำการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้ง เป็นเวลา 3 ครั้ง เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ



เลี้ยงทั้งใบ ตัดใบเป็นสองส่วน ตัดใบเป็นสามส่วน การกรีดแผ่นใบ

รูปที่ 1 การสร้างแผลกับแผ่นใบแบบต่าง ๆ

2. การศึกษาความเข้มข้นของซีโฟทาซิมต่อการสร้างแคลลัสและการสร้างยอด

ตัดใบอ่อนสีแดงจากต้นทั้งใบ ซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 หรือ สูตร 1.5 (อาหารชักนำยอดโดยตรงจากใบ) เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกผลการสร้างแคลลัส และ การสร้างยอด ย้ายแคลลัสและยอดที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้ง เป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบการสร้างแคลลัสและยอดในแต่ละหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิมทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 20 ใบ

3. การศึกษาวิธีการปลูกถ่ายยีนกับใบมังคุด

3.1. การศึกษาความเข้มข้นของคานามัยซินที่เหมาะต่อการคัดเลือกแคลลัสหลังการปลูกถ่าย

ตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอด ซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาจุ่มแช่กับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 ที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหารเหลวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นาน 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำมาวางเลี้ยงชักนำการสร้างแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม (สูตรที่ 3.1) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสเติมคานามัยซินระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการสร้างแคลลัส เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างหน่วยทดลองที่เลี้ยงร่วมและไม่เลี้ยงร่วมกับเชื้อข้างต้นโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

3.2. การศึกษาสายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัยคือ เชื้ออะโกรแบคทีเรียและเวลาในการอินคูเบท แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ดังนี้คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายเชื้อ คือ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121, เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* พันธุ์ป่า (wild type) สายเชื้อ A13 และเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 แต่ละสายเชื้อใช้เวลาในการอินคิวเบท 3 เวลา คือ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอด ซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาจุ่มแช่เชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหารเหลวเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำมาวางเลี้ยงชักนำการสร้างแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเลี้ยงไปบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.2) (ยกเว้น *Agrobacterium rhizogenes* พันธุ์ป่า สายเชื้อ A13 วางเลี้ยงบนอาหารเดิมไม่เติมสารปฏิชีวนะ) วางเลี้ยงภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและเวลาโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในแฟคทอเรียล วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

3.3. การศึกษาสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัยคือ เชื้ออะโกรแบคทีเรียและความหนาแน่น แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ดังนี้คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 เชื้อสาย คือ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok 233 และเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 แต่ละสายเชื้อใช้ความหนาแน่น 3 ระดับคือ ความหนาแน่น 4.95×10^9 9.9×10^9 และ 1.98×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอด ซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาเลี้ยงร่วมกับเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อทั้ง 3 ระดับ ในอาหารเหลวสูตร 1.2 บนเครื่องเขย่า 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1.2 เติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 อินคิวเบทด้วยอาหาร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แทนคานามัยซิน หลังจากเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายใบไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจาก วางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและความหนาแน่นโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในแฟคทอเรียล วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

3.4. ศึกษาวิธีการและเวลาเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอด ซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้นมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 ที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการเลี้ยงร่วม 4 วิธี คือ

1. เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก จึงกำจัดเชื้อ
2. เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก วางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อ
3. เลี้ยงร่วมโดยใช้อัลตราโซนิค 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก วางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อและ
4. การจุ่มแช่แล้วยกทันทีจากนั้นปักวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อ

หลังจากซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก และวางเลี้ยงตามวิธีการทั้ง 4 วิธี จึงกำจัดเชื้อโดยย้ายใบไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 เติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.1) เวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนแต่ละวิธีการเลี้ยงร่วมโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่ม

ตลอด วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

3.5. ศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัย ที่มีระดับไม่เท่ากัน ปัจจัยที่ 1 เป็นวิธีการเลี้ยงร่วมมี 2 ระดับ คือ การใช้อัตราโซนิค และ ไม่ใช้อัลตราโซนิค ส่วนอีกปัจจัยหนึ่งคือการสร้างแผลให้กับแผ่นใบมี 4 ระดับ คือ ใช้ใบทั้งใบโดยไม่มีการสร้างแผล สร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง สร้างแผลโดยกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1 รอย และสร้างแผลโดยกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบ 2 รอย

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงจากยอดมังคุดซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น และสร้างแผลให้กับแผ่นใบทั้ง 4 แบบ นำไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 ที่ผ่านการอินดิวเบทในอาหารเหลว 48 ชั่วโมง โดยใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาที และไม่ใช้อัลตราโซนิค ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำมาวางเลี้ยงชักนำการสร้างแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเลี้ยงไปบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกข้อมูลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบเมื่อใช้และไม่ใช้อัลตราโซนิคโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในแฟคทอเรียล วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

3.6. การศึกษาสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดต่อการสร้างแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ทดสอบ 2 ปัจจัยคือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และ ชิ้นส่วนของมังคุด แต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ ดังนี้คือ เชื้ออะโกรแบ่คทีเรีย 2 สายเชื้อ คือ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 และเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok 233 ส่วนชิ้นส่วนที่ใช้ คือ ใบอ่อนสีแดงและส่วนของลำต้น

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบและส่วนของลำต้นจากยอดมังคุดซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาจุ่มแช่เชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการอินดิวเบทในอาหารเหลวตามวิธีการข้างต้นเป็น

เวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนใบและลำต้นมาวางเลี้ยงชักนำการสร้างแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเลี้ยงไปบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกข้อมูลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในแฟคทอเรียล วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองย่อยทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อการชักนำสร้างแคลลัส

ผลการชักนำการสร้างแคลลัสจากใบทั้ง 4 หน่วยการทดลอง พบว่าการสร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวางให้การสร้างแคลลัสได้สูงที่สุด 94 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การเลี้ยงทั้งใบ และสร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวางให้แคลลัส 78 และ 67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการกรีดแผ่นใบบริเวณเส้นกลางใบตามขวางให้แคลลัสได้น้อยที่สุด 48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) สำหรับตำแหน่งการสร้างแคลลัส พบว่าส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ดีบริเวณโคนใบ (proximal end) ของทุกชิ้นส่วน (ส่วนโคนใบ, ส่วนกลางใบ และส่วนปลายใบ) ไม่ว่าจะเป็นการเลี้ยงทั้งใบการสร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง และ ตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวาง แคลลัสบริเวณดังกล่าวมีการเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าส่วนอื่น (ตารางที่ 2, รูปที่ 2 และรูปที่ 3) ลักษณะของแคลลัสที่สร้างจากตำแหน่งต่างๆ มีความแตกต่างกันดังนี้คือด้านโคนใบแคลลัสมีสีเขียวอมเหลือง เกาะตัวกันแน่น (compact) ในขณะที่แคลลัสที่สร้างบริเวณปลายใบ (distal end) เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (friable) มีสีเหลือง ขาว เทา ส่วนหน่วยทดลองที่มีการกรีดใบพบว่ามีการสร้างแคลลัสได้ดีเมื่อมีการกรีดใบ 1 - 2 รอย แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่ สร้างจากบริเวณของเส้นกลางใบตรงบริเวณรอยกรีดทั้ง 2 ด้าน สำหรับใบที่มีการกรีด 3 รอย และ ใบแบ่ง 3 ส่วน สร้างแคลลัสได้น้อยที่สุด แคลลัสมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ใบแสดงอาการผิดปกติ มีการสร้างแคลลัสเป็นลักษณะฟองฟู (รูปที่ 4) คล้ายเป็นกลุ่มของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ไม่สามารถพัฒนาการต่อไปได้ เมื่อมีการย้ายเลี้ยง และมีการสร้างแคลลัสบริเวณแผ่นใบ มากกว่าหน่วยทดลองที่มีการเลี้ยงทั้งใบ ใบแบ่งครึ่ง

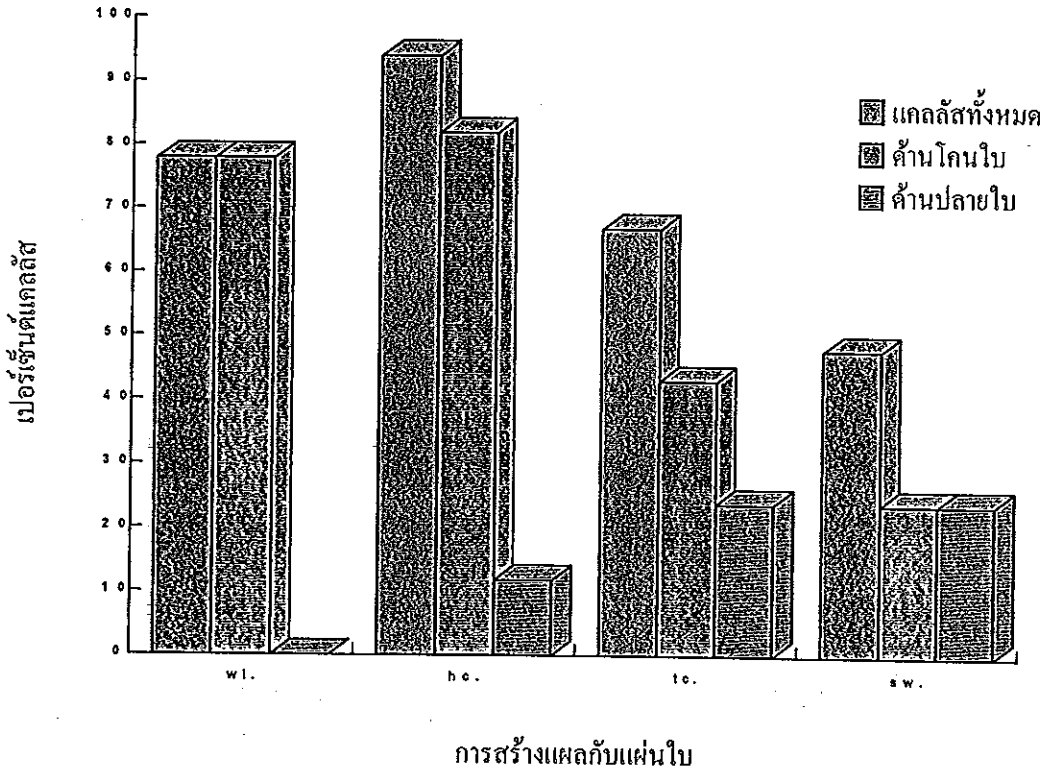
ตารางที่ 1 ผลของวิธีการสร้างแผลกับใบมังคุดต่อการชักนำแคลลัส

หน่วยทดลอง		เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส[1]
1. เลี้ยงทั้งใบ		78 b
2. ตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง		94 a
ด้านโคนใบ	82	
ด้านปลายใบ	12	
3. ตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวาง		67 b
ด้านโคนใบ	43	
ด้านปลายใบ	24	
4. กรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-3 รอย		48 c
รอยกรีดด้านโคนใบ	24	
รอยกรีดด้านปลายใบ	24	
F-test		**
C.V. (%)		9.21

(1) เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสวัดจากจำนวนใบทั้งหมดที่สามารถสร้างแคลลัสได้

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม SAS



รูปที่ 2 ผลของวิธีการสร้างแผลกับใบมังคุดต่อการชักนำแคลลัส

wl: whole leaf (เลี้ยงทั้งใบ)

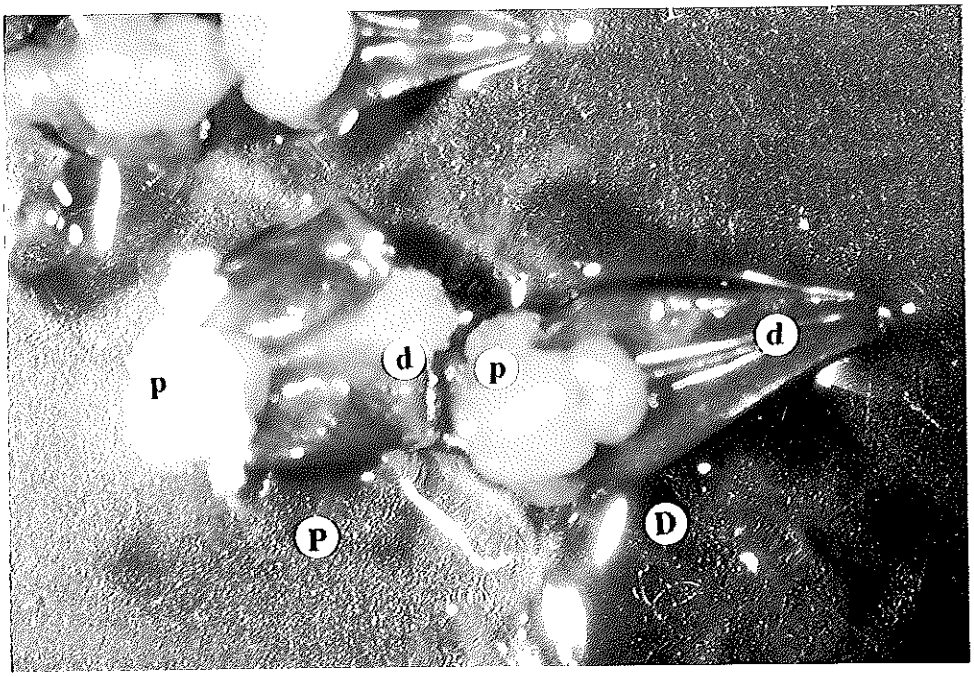
hc: half cutting (ตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง)

tc: triple cutting (ตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวาง)

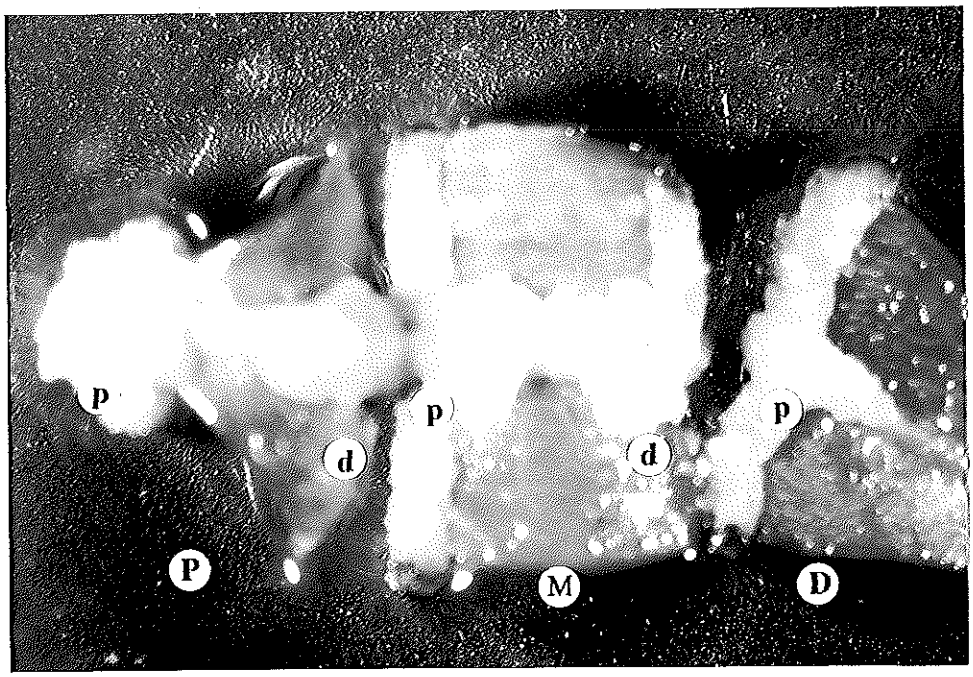
sw: strip wounding (กรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-3 รอย)

ตารางที่ 2 ผลของวิธีการสร้างแผลกับใบมังคุดต่อการสร้างแคลลัส

หน่วยทดลอง	เปอร์เซ็นต์แคลลัส	การเพิ่มปริมาณ	ลักษณะแคลลัส	สีแคลลัส
1. เลี้ยงทั้งใบ				
ด้านโคนใบ	78	+ + + +	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เทา
ด้านปลายใบ	0	0		
2. ตัดแบ่งใบเป็นสองส่วน				
ส่วนโคนใบ	94		เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เทา
ด้านโคนใบ	31	+ + + +	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เทา
ด้านปลายใบ	12	+ +	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เหลือง
ทั้ง 2 ด้าน	51	+++	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เหลือง
ส่วนปลายใบ	72			
ด้านโคนใบ	72	+ + +	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เหลือง/ขา
ด้านปลายใบ	0	0		
ทั้ง 2 ด้าน	0	0		
3. ตัดแบ่งใบเป็นสามส่วน				
ส่วนโคนใบ	59			
ด้านโคนใบ	8	+ + +	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เทา/เหลือง
ด้านปลายใบ	0	0		
ทั้ง 2 ด้าน	51	+++	เกาะตัวกันแน่น	
ส่วนกลางใบ	39			
ด้านโคนใบ	14	+ + +	เกาะตัวกันแน่น	เขียว/เหลือง/ขาว
ด้านปลายใบ	0	0		
ทั้ง 2 ด้าน	25	++	เกาะตัวกันแน่น/หลวม	เขียว/เหลือง/ขาว
ส่วนปลายใบ	33			
ด้านโคนใบ	32	+ +	เกาะตัวกันแน่น/หลวม	เหลือง/ขาว
ด้านปลายใบ	1	+	เกาะตัวกันหลวม ๆ	เหลือง
ทั้ง 2 ด้าน	0	0		
4. กรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบ				
1-3 รอย				
รอยกรีดด้านโคนใบ	24	+ + +	เกาะตัวกันแน่น	เหลือง/เทา
รอยกรีดด้านปลายใบ	24	+	เกาะตัวกันแน่น	เหลือง/เทา



รูปที่ 3 แคลลัสจากการสร้างแผลกับใบมังคุดโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง



รูปที่ 4 แคลลัสจากการสร้างแผลกับใบมังคุดโดยตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวาง

D: distal explant (ส่วนปลายใบ) P: proximal explant (ส่วนโคนใบ)

M: middle explant (ส่วนกลางใบ) d: distal end (ด้านปลายใบ)

p: proximal end (ด้านโคนใบ)

2. การศึกษาความเข้มข้นของซีโฟทาซิมต่อการสร้างแคลลัสและการสร้างยอด

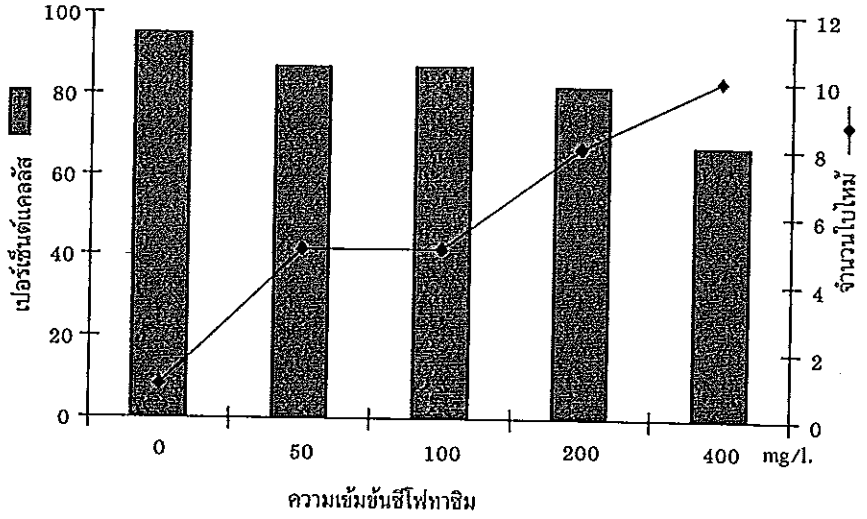
จากการศึกษาการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบมาวางเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างแคลลัส 1.2 เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.1) เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าใบที่วางเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซิมสามารถสร้างแคลลัสได้สูงที่สุด 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติมซีโฟทาซิม 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสร้างแคลลัสได้ 87, 87, และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิม 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ำสุด 67 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสิถิติกับหน่วยทดลองอื่น (ตารางที่ 3) ลักษณะของแคลลัสที่ได้ในอาหารเติมซีโฟทาซิม 0, 50, และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะเหมือนกันมีสีเขียวอมเหลือง เป็นแคลลัสชนิดที่เกาะตัวกันแน่น แต่ใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิมได้จากความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอาการใบไหม้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ หลังจากย้ายใบไปเลี้ยงในอาหารสูตร 1.3 เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นระดับต่างๆ เพื่อชักนำการสร้างยอด พบว่ามีการพัฒนาช้าและได้ยอดเพียง 3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยอดที่ได้มีลักษณะไม่สมบูรณ์แสดงอาการแคระ ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นอื่นๆ สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3 รูปที่ 5 และ รูปที่ 6)

สำหรับการศึกษาการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบไปวางเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากใบ เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 1.5) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิม 50 สามารถสร้างยอดได้สูงสุด 38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใบที่วางเลี้ยงโดยไม่เติมซีโฟทาซิม และเติมซีโฟทาซิม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสร้างยอดได้ 35 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะยอดที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิม 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างยอดได้ 20 และ 22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับหน่วยทดลองอื่นๆ และพบว่าใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงอาการไหม้สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ จำนวนยอดที่สร้างในอาหารเติมซีโฟทาซิมเข้มข้นทุกระดับความเข้มข้นมีประมาณ 1-4 ยอดต่อใบ ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4 รูปที่ 7 และ รูปที่ 8) และมีใบบางส่วนที่มีการพัฒนาการของจุดกำเนิดตายอดช้า เมื่อมองดูด้วยสายตามีลักษณะเหมือนการสร้างแคลลัสแต่เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรน์สเตอริโอกำลังขยาย 6.25 เท่า พบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวเป็นจุดกำเนิดตายอดซึ่งหลังจากย้ายเลี้ยงต่อไปพบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นยอดได้ (ตารางที่ 4 รูปที่ 9 รูปที่ 10)

ตารางที่ 3 ผลของซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างแคลลัสของใบมังคุดบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซีโฟทาซิม (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์แคลลัส	จำนวนใบไหม้
0	95 a	1
50	87 ab	5
100	87ab	5
200	82ab	8
400	67 b	10
F-test	*	
C.V. (%)	10.16	

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม SAS



รูปที่ 5 ผลของซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างแคลลัสจากใบมังคุดบนอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ เท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

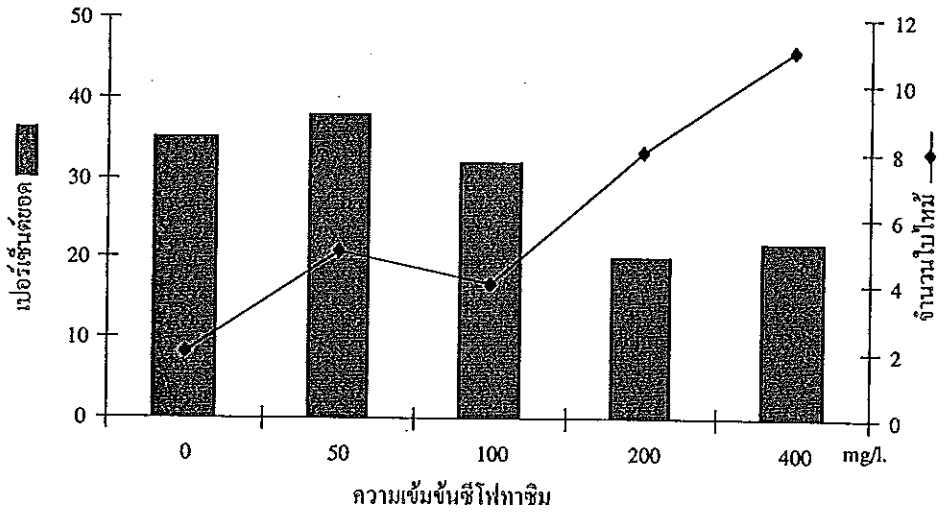
รูปที่ 6 ผลของซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างกลุ่มตารวมและยอดบนอาหาร MS เติม BA และ TDZ เท่ากันอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

รูปที่ 7 ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการสร้างยอดโดยตรงบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน

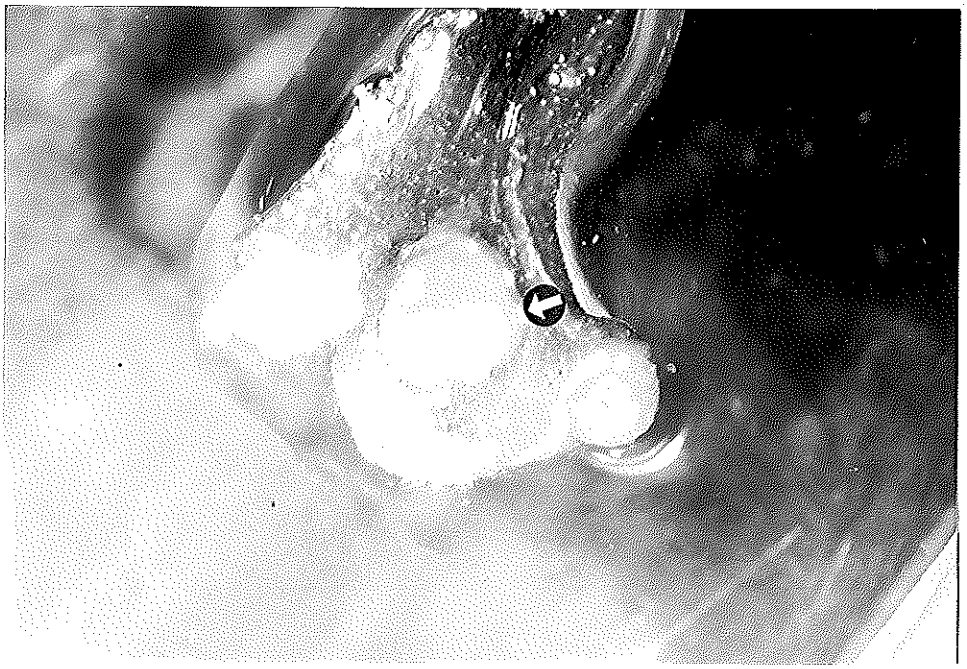
ตารางที่ 4 ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการสร้างยอดจากใบมังคุดบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ซีโฟทาซิม (มล./ล.)	เปอร์เซ็นต์แคลลัส	เปอร์เซ็นต์ยอด	จำนวนใบไหม้
0	1	35 a	2
50	2	38 a	5
100	1	32 ab	4
200	1	20 b	8
400	1	22 b	11
F-test		**	
C.V. (%)		13.67	

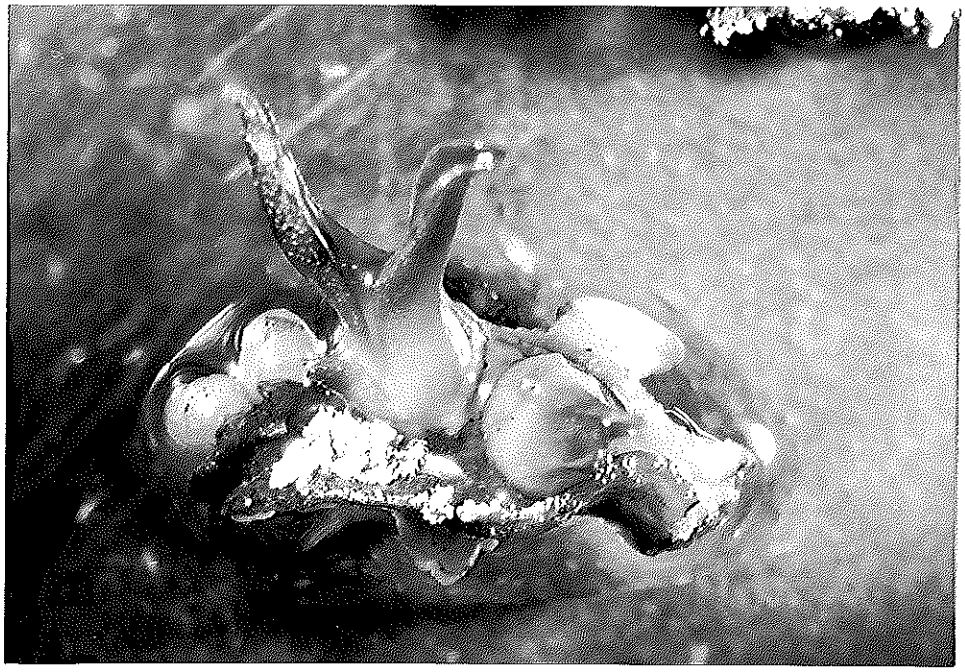
** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม SAS



รูปที่ 8 ผลของซีโฟทาซิมระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการสร้างยอดจากใบมังคุดบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 9 ลักษณะของจุดกำเนิดยอด (ศรชี้) คล้ายการสร้างแคลลัส บนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 10 ลักษณะของการสร้างยอดโดยตรงจากใบบนอาหารสูตร WPM เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

3. การศึกษาวิธีการปลูกถ่ายยีนกับใบมังคุด

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของคานามัยซินที่เหมาะต่อการคัดเลือกแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาความเข้มข้นของคานามัยซินต่อความสามารถในการสร้างแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน โดยใช้ใบทั้งใบเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 พบว่าเริ่มมีการสร้างแคลลัสหลังวางเลี้ยงได้ 19 วัน ในช่วงระยะเวลาการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ที่ทุกระดับความเข้มข้นของคานามัยซิน (0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความสามารถสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทั้งการเลี้ยงร่วมและไม่เลี้ยงร่วม แต่มีแนวโน้มว่าใบที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อสร้างแคลลัสได้สูงกว่าการไม่เลี้ยงร่วมการเลี้ยงร่วมกับเชื้อสามารถชักนำแคลลัสได้ 52 และ 50 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเติมคานามัยซินระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ในขณะที่หน่วยทดลองที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมมีการสร้างแคลลัสได้ 30 และ 42 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 พบว่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้นของคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การเลี้ยงร่วมให้เปอร์เซ็นต์แคลลัส 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมสร้างแคลลัสได้ 3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 รูปที่ 11) อย่างไรก็ตามหลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 และหลังจากย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำยอดและคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน พบว่ามีแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้เพียง 2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ใบที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียไม่มีแคลลัสรอดชีวิต ยกเว้นชุดเปรียบเทียบที่ไม่เติมคานามัยซิน แต่แคลลัสที่รอดชีวิตดังกล่าวมีการพัฒนาเป็นกลุ่มตารวมได้เพียงระยะหนึ่ง ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้เปลี่ยนเป็นสีดำและตายหลังจากย้ายเลี้ยงต่อไปอีก 2 เดือน จากการสุ่มแคลลัสรอดชีวิตหลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 1 เดือน จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ด้วยวิธีเนื้อเยื่อเคมี ยังไม่พบกิจกรรมของ GUS

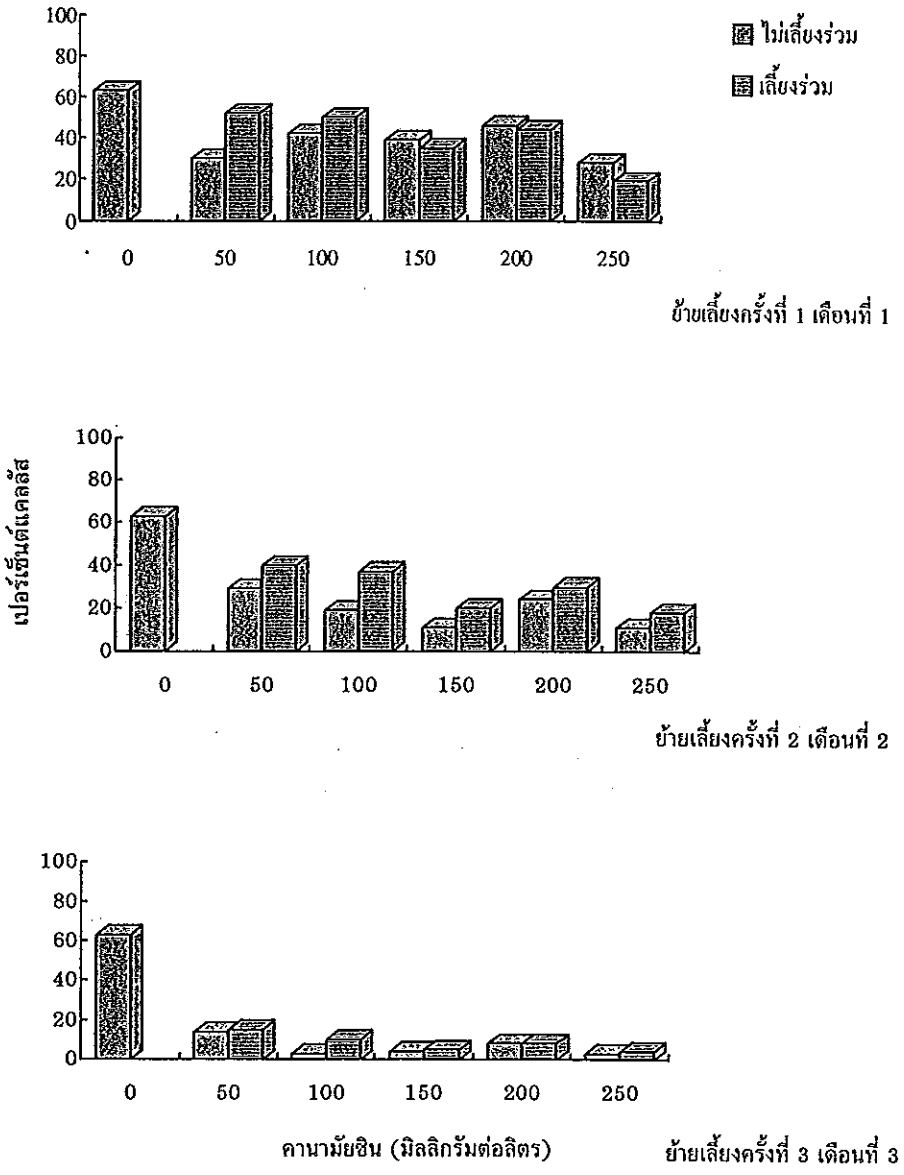
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์แคลลัสจากการเลี้ยงใบมังคุดร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) ต่อการปลูกถ่ายยีนบนอาหารเติมคานามัยซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

	ระดับความเข้มข้นของคานามัยซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
หน่วยทดลอง	0	50	100	150	200	250
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1.						
ไม่เลี้ยงร่วม	63	30	42	39	46	28
เลี้ยงร่วม		52	50	35	44	19
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)		37.60	40.48	33.90	36.83	76.36
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2.						
ไม่เลี้ยงร่วม	63	29	19	11	24	11
เลี้ยงร่วม		40	37	20	30	18
F-test		ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)		31.66	65.85	58.42	47.24	89.92
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3						
ไม่เลี้ยงร่วม	63	14	3 b	4	8	3
เลี้ยงร่วม		15	10 a	5	8	4
F-test		ns	*	ns	ns	ns
C.V. (%)		54.88	48.65	31.43	70.27	40.41
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4						
ไม่เลี้ยงร่วม	63	0	0	0	0	0
เลี้ยงร่วม		2	0	0	0	0

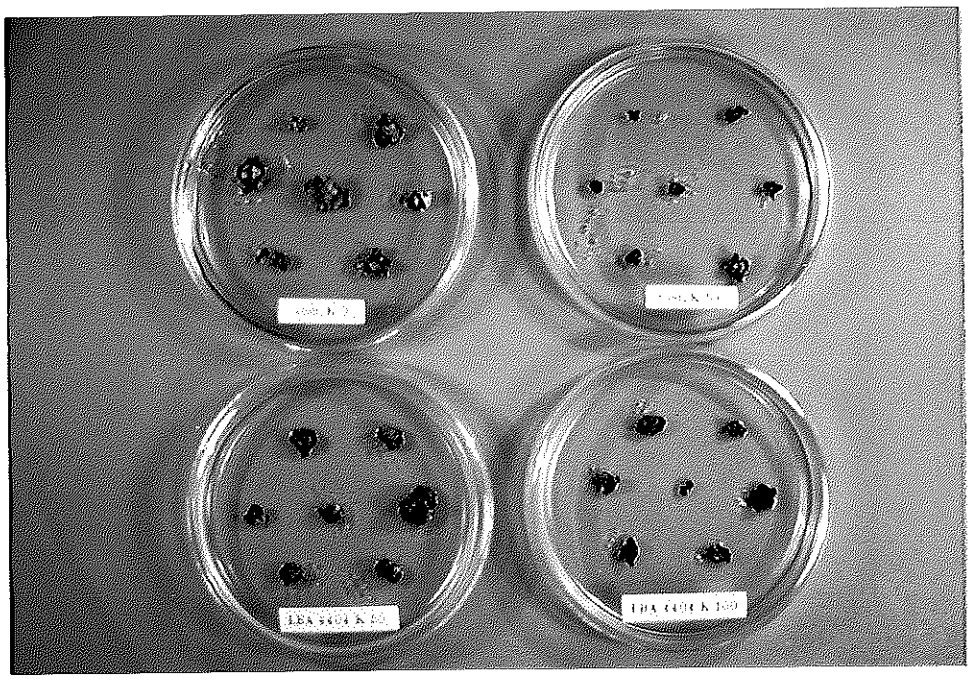
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม SAS



รูปที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่สามารถต้านทานต่อคานามัยซินระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 12 แคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดเป็นเวลา 3 เดือน โดยอาศัยยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินบนพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก
cont.K0: ไม่เลี้ยงร่วมเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน
cont.K50: ไม่เลี้ยงร่วมวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
LBA 4404 K50: เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 วางเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
LBA 4404 K100: เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 พลาสมิด pBI 121 วางเลี้ยง บนอาหารเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2. การศึกษาสายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

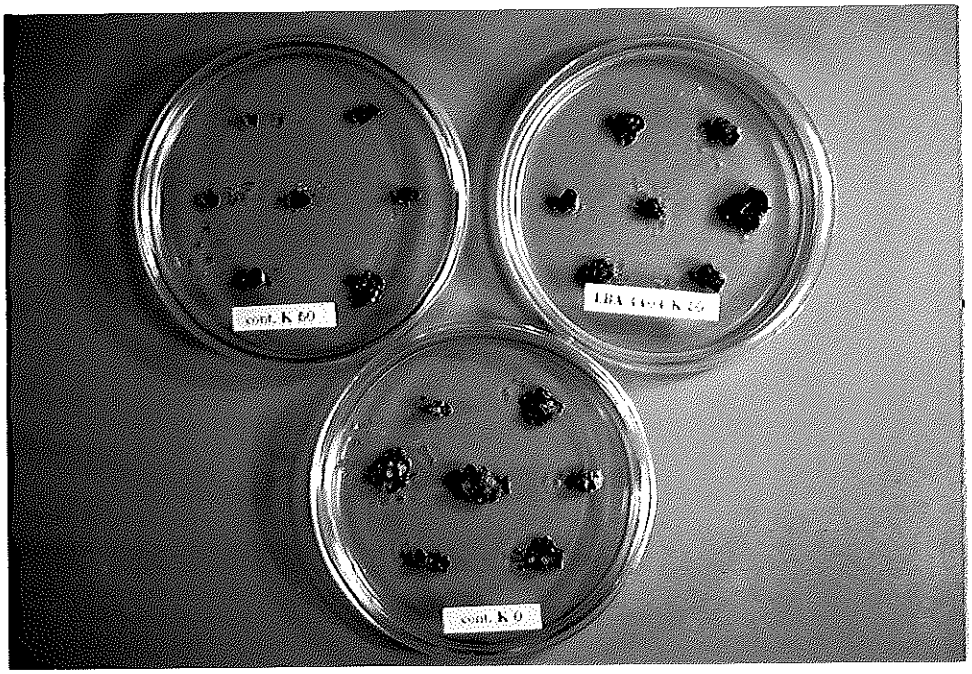
ผลการศึกษาการใช้สายเชื้อ 3 สายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่างกัน 3 เวลา พบว่าใบเริ่มมีการสร้างแคลลัสหลังวางเลี้ยง 19 วัน หลังจากการวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าใบที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่างกัน สามารถสร้างแคลลัสได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสายเชื้อ LBA 4404 ที่มี pBI 121 มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีน 48.33 และ 38.33 เปอร์เซ็นต์ ในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ สูงกว่าสายเชื้ออื่นๆ ส่วนเวลาในการอินคิวเบทพบว่าเวลาที่มีแนวโน้มในการให้แคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนสูงสุด คือ การอินคิวเบทที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินเฉลี่ย 45.66 และ 31.33 เปอร์เซ็นต์ ในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ส่วนสายเชื้อ A13 WT (wild type; พันธุ์ป่า) เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พัฒนาตามปกติไม่มีการตายเกิดขึ้น สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ไม่แตกต่างกับแคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อและวางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน แต่ไม่มีการสร้างรากฝอยหรือรากลอยให้เห็น หลังจากการย้ายแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำยอดและคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน พบว่าได้แคลลัสพัฒนาไปเป็นกลุ่มตารวมที่ต้านทานต่อคานามัยซินเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ เฉพาะสายเชื้อ LBA 4404 pBI 121 (รูปที่ 13) แต่หลังจากย้ายเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือนพบว่ากลุ่มตารวมดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาการต่อไปเป็นต้นได้เปลี่ยนเป็นสีดำและตาย ในขณะชิ้นส่วนที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะกลุ่มตารวมสามารถพัฒนาไปยอดรวมและต้นได้ (รูปที่ 14) จากการสุ่มแคลลัสรอดชีวิตหลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 1 เดือน จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ด้วยวิธีเนื้อเยื่อเคมี ยังไม่พบกิจกรรมของ GUS

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์แคลลัสหลังการเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อและเวลาในการอินดิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

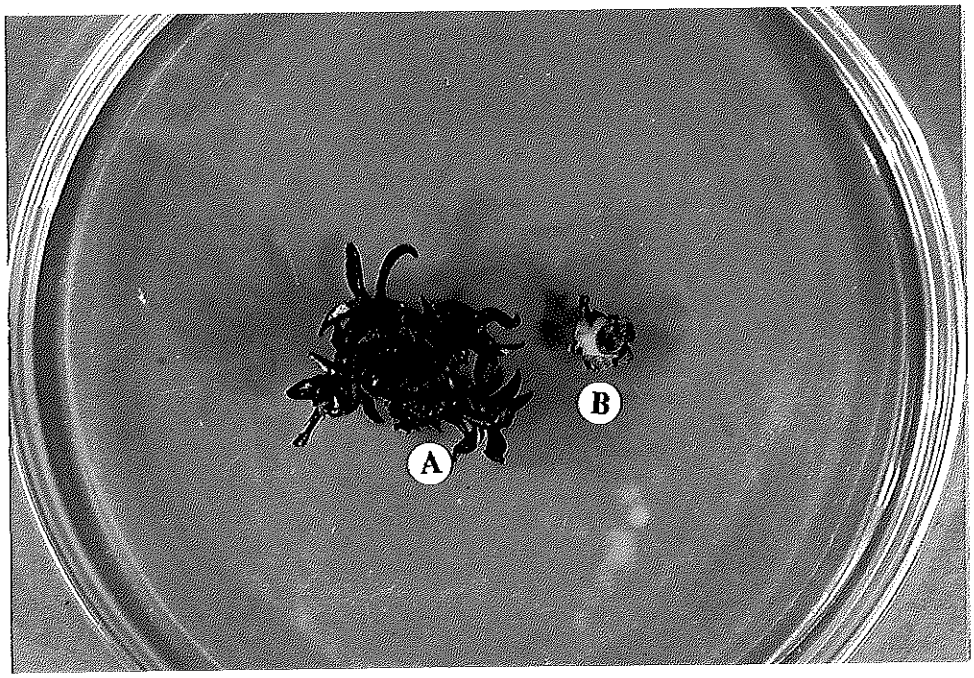
	เวลาอินดิวเบท (ชม)				
สายเชื้อ	24	36	48	เฉลี่ย	F-test
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1					
A13 (WT) [1]	39	48	30	39	
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	30	30	30	30	
A13 (pBI 121)	46	17	55	39.33	
LBA 4404 (pBI 121)	40	49	52	48.33	
เฉลี่ย	38.66	32	45.66		ns
F-test				ns	
C.V. (%)					42.44
ย้ายเลี้ยงครั้งที่2					
A13 (WT)	33	30	29	30.67	
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	20	20	20	20	
A13 (pBI 121)	26	17	34	25.67	
LBA 4404 (pBI 121)	35	33	40	38.33	
เฉลี่ย	27	23.33	31.33		ns
F-test				ns	
C.V.(%)					40.12
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3					
A13 (WT)	25	39	25	29.55	
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	3	3	3	3	
A13 (pBI 121)	0	4	3	2.33	
LBA 4404 (pBI 121)	0	3	6	3	
เฉลี่ย	1	3.33	4		
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4					
A13 (WT)	25	39	25	29.55	
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	0	0	0	0	
A13 (pBI 121)	0	0	0	0	
LBA 4404 (pBI 121)	0	0	2	0.66	
เฉลี่ย	0	0	0.66		

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

(1) ไม่ใช้ A13 (WT) ในการเปรียบเทียบทางสถิติ



รูปที่ 13 แคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดเป็นเวลา 3 เดือน โดยอาศัยยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินบนพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก
cont.K50: ไม่เลี้ยงร่วมวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
LBA 4404 K50: เลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 pBI 121 วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
cont. K0: ไม่เลี้ยงร่วมเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน



รูปที่ 14 กลุ่มตารวมที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อวางเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน (A) และ ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ LBA 4404 ที่มี pBI 121 (B)

3.3. การศึกษาสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาสายเชื้อ 3 สายเชื้อ และความหนาแน่นเชื้อ 3 ระดับต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนพบว่าเริ่มมีการสร้างแคลลัสหลังการวางเลี้ยง 19 วัน สายเชื้อที่ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนสูงที่สุดคือ A13 (pBI 121) ซึ่งให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินเฉลี่ย 39.67 เปอร์เซ็นต์ และ 18.66 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับสายเชื้ออื่นและหน่วยทดลองเปรียบเทียบ รองลงมาคือสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) ให้แคลลัสที่มีความต้านทานได้ 29 และ 15.67 เปอร์เซ็นต์ ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ และ 2 ตามลำดับ ส่วนระดับความหนาแน่นของเชื้อที่ให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้สูงสุดคือ 1.98 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินเฉลี่ย 35.75 และ 19 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 9.90 x 10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินได้ 22.5, 12.25 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 4.95 x 10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร สร้างแคลลัสได้ 21.75 และ 13.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) หลังจากย้ายไปเลี้ยงยังอาหาร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนพบว่า การใช้สายเชื้อ A13 (pBI 121) ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสรอดชีวิต 1.33 เปอร์เซ็นต์ สายเชื้อ LBA 4404 pBI 121 และ LBA 4404 pTok 233 ให้แคลลัสรอดชีวิต 0.66 และ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนระดับความหนาแน่นที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสสูงสุดคือที่ระดับความหนาแน่น 1.98 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้แคลลัสรอดชีวิตได้ 0.75 เปอร์เซ็นต์ แต่แคลลัสดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มตารวมหรือยอดได้เปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด ในขณะที่แคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมและวางเลี้ยงบนอาหารไม่เติมคานามัยซิน สามารถพัฒนาไปเป็นกลุ่มตารวมและยอดได้ (รูปที่ 15) จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 2 พบว่าการใช้ระดับความหนาแน่นเชื้อสูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้การปลูกถ่ายยีนการสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินและการรอดชีวิตของแคลลัสสูงขึ้น สายเชื้อที่ให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงสุดคือ A13 (pBI 121) 56 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121) 45 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 1.98x10^{10}เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนสายเชื้อ LBA 4404 (pTok 233) ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินต่ำสุด 13 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความหนาแน่น 4.95x10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนความหนาแน่นที่ 9.90x10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้การสร้างแคลลัส LBA 4404 pBI 121 ลดลงแต่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระดับความหนาแนนสูงขึ้นเป็น 1.98x10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 7 รูปที่ 16)

ตารางที่ 7 ผลของสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน (วัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย)

	ความหนาแน่นของเชื้อ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)				
สายเชื้อ	4.95×10^9	9.90×10^9	1.98×10^{10}	เฉลี่ย	F-test
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1					
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	18	18	18	18 c	
A13 (pBI 121)	31	32	56	39.67 a	
LBA 4404 (pBI 121)	25	17	45	29 b	
LBA 4404 (pTok 233)	13	23	24	20 bc	
เฉลี่ย	21.75 b	22.5 b	35.75 a		**
F-test				**	
C.V. (%)					34.05
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2					
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	14	14	14	14	
A13 (pBI 121)	15	12	29	18.66	
LBA 4404 (pBI 121)	15	14	18	15.67	
LBA 4404 (pTok 233)	10	9	18	12.33	
เฉลี่ย	13.5 b	12.25 b	19 a		**
F-test				ns	
C.V. (%)					47.70
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3					
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	1	1	1	1	
A13 (pBI 121)	2	3	5	3.33	
LBA 4404 (pBI 121)	2	2	4	2.66	
LBA 4404 (pTok 233)	2	0	2	1.33	
เฉลี่ย	1.75	1.5	3		
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4					
หน่วยทดลองเปรียบเทียบ	0	0	0	0	
A13 (pBI 121)	1	1	2	1.33	
LBA 4404 (pBI 121)	1	1	0	0.66	
LBA 4404 (pTok 233)	0	0	1	0.33	
เฉลี่ย	0.5	0.5	0.75		

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

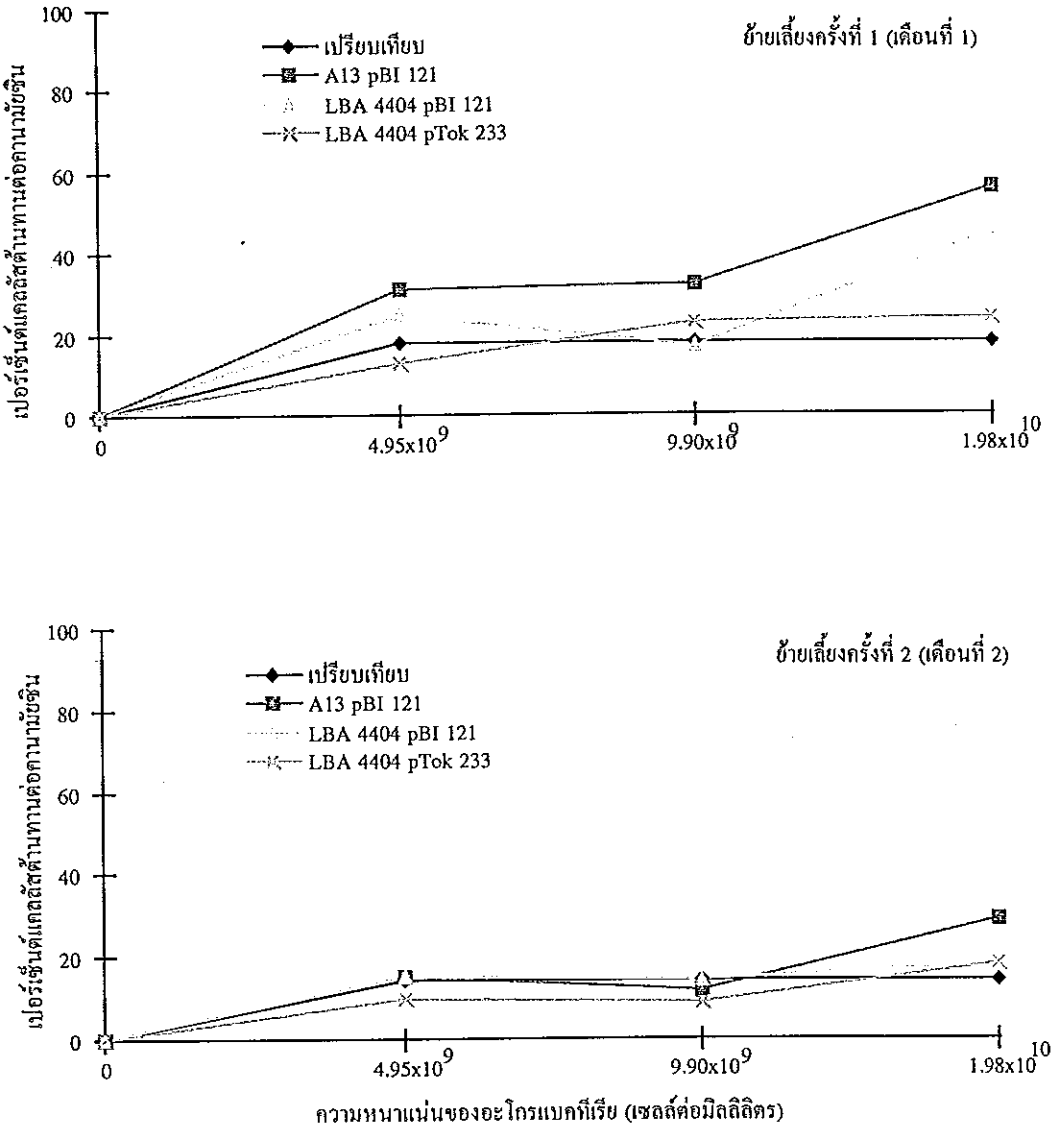
ค่าเฉลี่ยในแถวหรือคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม SAS

รูปที่ 15 ผลของสายเชื้อที่ความหนาแน่น $1.98x10^{10}$เซลล์ต่อมิลลิลิตร ต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนวัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย

A: แคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วม,

B: เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ A13 (pBI 121)

C: เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 121)



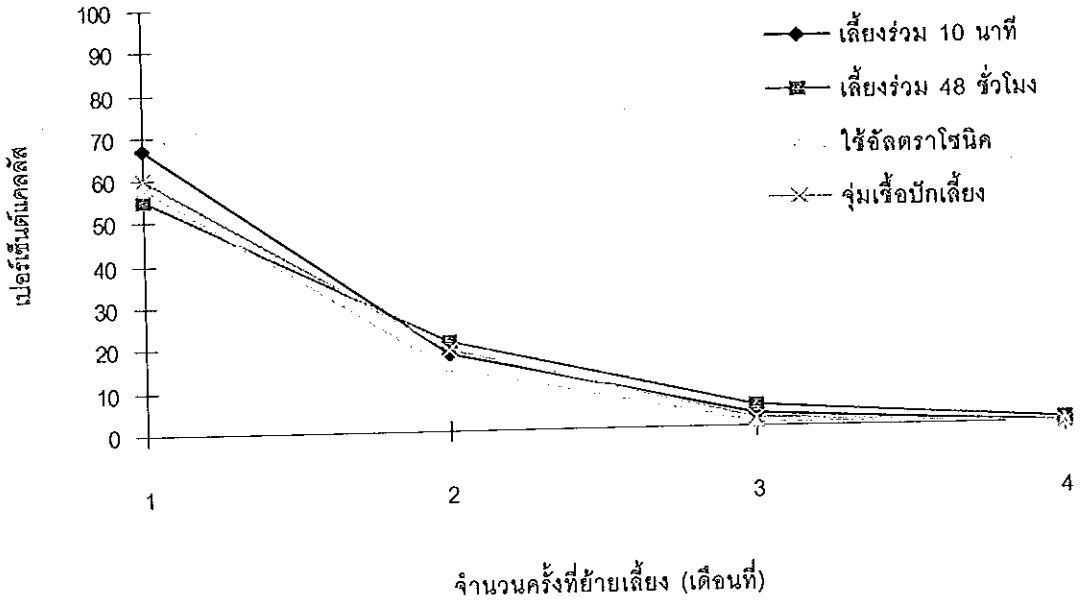
รูปที่ 16 แสดงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายเชื้อกับระดับความหนาแน่นของเชื้อ

3.4. ศึกษาวิธีการและเวลาเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

จากการศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วมแตกต่างกัน 4 วิธี คือ 1. เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก จึงกำจัดเชื้อ 2. เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก วางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อ 3. เลี้ยงร่วมโดยใช้อัลตราโซนิค 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก วางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อและ 4. การจุ่มเชื้อแล้วยกทันทีจากนั้นปักวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนพบว่าใบสามารถสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที มีแนวโน้มการสร้างแคลลัสได้สูงกว่าคือ 67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ การเลี้ยงด้วยวิธีจุ่มเชื้อปักเลี้ยงสร้างแคลลัสได้ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากวางเลี้ยงได้ 2 เดือน พบว่าแคลลัสที่วางเลี้ยง 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงสุด 21 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือการเลี้ยงร่วมด้วยวิธีการจุ่มเชื้อปักเลี้ยง และการเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ให้แคลลัสรอดชีวิต 19 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการวางเลี้ยงโดยใช้อัลตราโซนิคสร้างแคลลัสได้ 15 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 เหลือแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินลดลง การย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและคัดเลือก พบว่ามีแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ของการเลี้ยงร่วมที่เวลา 48 ชั่วโมงเพียงการทดลองเดียวเท่านั้น ส่วนการทดลองอื่นๆ ไม่มีแคลลัสรอดชีวิต จึงพอสรุปได้ว่าการเลี้ยงร่วมที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้มีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนสูงกว่าวิธีการอื่น (ตารางที่ 8 รูปที่ 17)

ตารางที่ 8 ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมต่อการปลูกถ่ายยีน (วัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย)

	เปอร์เซ็นต์แคลลัส			
วิธีการ	ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1	ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2	ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3	ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4
เลี้ยงร่วม 10 นาที	67	18 a	3	0
เลี้ยงร่วม 48 ชั่วโมง	55	21 a	5	1
ใช้อัลตราโซนิค 10 นาที	58	15 b	1	0
จุ่มเชื้อปักเลี้ยง	60	19 a	2	0
F-test	ns	*		
C.V. (%)	23.52	17.52		



รูปที่ 17 ผลของวิธีการเลี้ยงร่วมต่อการปลูกถ่ายยีนวัดจากความสามารถในการต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย

3.5. ศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ผลการสร้างแผลกับแผ่นใบแบบต่าง ๆและการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาทีต่อความสามารถในการปลูกถ่ายถ่ายยีนเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ พบว่าการไม่ใช้และการใช้อัลตราโซนิค เสริมการสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบความสามารถดังกล่าวหลังเลี้ยงแคลลัสในอาหารเติมคานามัยซินเป็นเวลา 1 และ 2 เดือน พบว่าหน่วยทดลองที่ไม่ใช้อัลตราโซนิคให้เปอร์เซ็นต์แคลลัส 69.25 และ 32.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้อัลตราโซนิคให้เปอร์เซ็นต์แคลลัส 59.50 และ 30.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) ส่วนการสร้างแผลกับแผ่นใบทั้ง 4 แบบ พบว่าใบแบ่งครึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้สูงสุด 85.5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเลี้ยงทั้งใบ กรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1 และ 2 รอย ซึ่งให้ เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 70, 58.5 และ 43.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ถึงแม้การใช้และการไม่ใช้อัลตราโซนิคให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินไม่แตกต่างกันใบที่ใช้อัลตราโซนิคมีลักษณะไหม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มากกว่าและตายเร็วกว่าใบที่ไม่ใช้อัลตราโซนิค (รูปที่ 18) หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซินของการตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง และการเลี้ยงทั้งใบ 41 และ 39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง กับการกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-2 รอย ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 25 และ 21.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากการย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและคัดเลือก พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินของใบที่วางเลี้ยงทั้งใบและการตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวางร่วมกับวิธีการเลี้ยงร่วมโดยไม่ใช้อัลตราโซนิคเท่านั้น ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ไม่พบปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 2 (รูปที่ 19)

ตารางที่ 9 ผลของวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัส

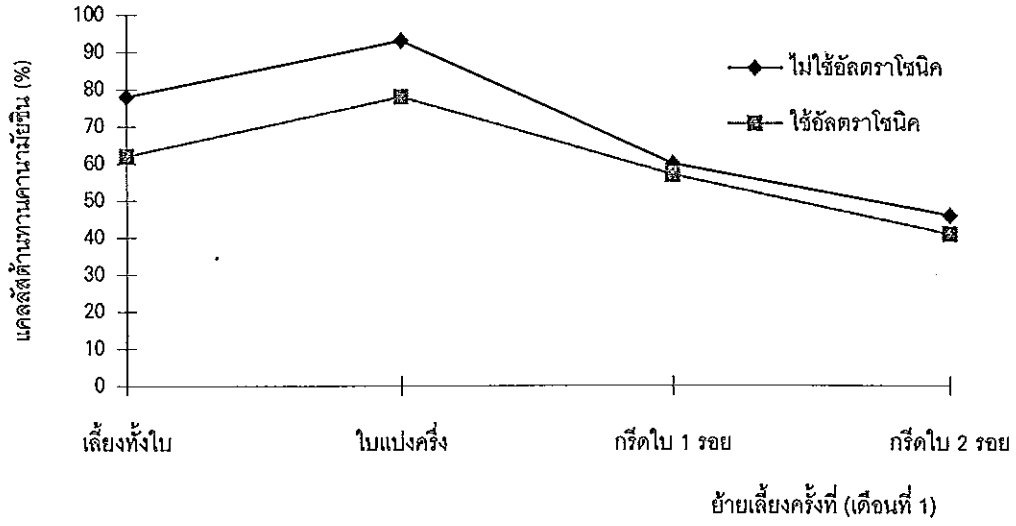
	การสร้างแผลกับแผ่นใบ					
หน่วยทดลอง	เลี้ยงทั้งใบ	ใบแบ่งครึ่ง	กรีดใบ 1 รอย	กรีดใบ 2 รอย	เฉลี่ย	F-test
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1						
ไม่ใช้อัลตราโซนิค	78	93	60	46	69.25	
ใช้อัลตราโซนิค	62	78	57	41	59.50	
เฉลี่ย	70.00 b	85.50 a	58.50 b	43.50 b		**
F-test					ns	
C.V. (%)						16.53
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2						
ไม่ใช้อัลตราโซนิค	39	43	26	23	32.75	
ใช้อัลตราโซนิค	39	39	24	20	30.50	
เฉลี่ย	39.00 a	41.00 a	25.00 b	21.50 b		**
F-test					ns	
C.V. (%)						16.40
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3						
ไม่ใช้อัลตราโซนิค	10	7	7	3	6.75	
ใช้อัลตราโซนิค	3	3	2	2	2.50	
เฉลี่ย	6.50	5.00	4.50	2.50		
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4						
ไม่ใช้อัลตราโซนิค	2	1	0	0		
ใช้อัลตราโซนิค	0	0	0	0		
เฉลี่ย	1.00	0.50	0	0		

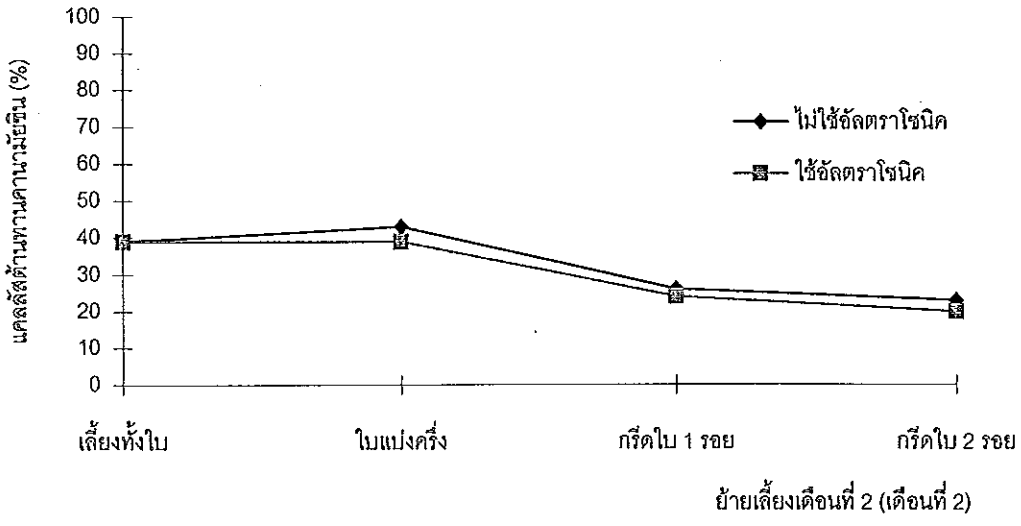
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ค่าเฉลี่ยในแถวหรือคอลัมภ์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DMRT โดยโปรแกรม SAS

รูปที่ 18 ผลของวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัส
A: ใบแบ่งครึ่งไม่ใช้อัลตราโซนิค, B: ใบแบ่งครึ่งใช้อัลตราโซนิค
C: เลี้ยงทั้งใบไม่ใช้อัลตราโซนิค, D: เลี้ยงทั้งใบใช้อัลตราโซนิค





รูปที่ 19 ผลของวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัส

3.6. การศึกษาสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดต่อการสร้างแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน

ผลการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบและส่วนของลำต้นอ่อนเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายเชื้อต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เมื่อตรวจสอบผลทั้ง 2 ปัจจัย มีเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามใบสีแดงให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 59 เปอร์เซ็นต์ และ 24.5 เปอร์เซ็นต์ ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 มีแนวโน้มดีกว่าการใช้ส่วนของลำต้นซึ่งให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน.49 เปอร์เซ็นต์ และ 18.5 เปอร์เซ็นต์ การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ สำหรับสายเชื้อ LBA 4404 pBI 121 ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานมัยซิน 54 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์ ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนสายเชื้อ LBA 4404 pTok 233 ให้แคลลัส 54 และ 20.5 เปอร์เซ็นต์ ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) หลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4 เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ และตายในที่สุด

ตารางที่ 10 ผลของสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและการสร้างแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซิน

	ชิ้นส่วนมังคุด			
สายเชื้อ	ใบสีแดง	ลำต้น	เฉลี่ย	F- test
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1				
LBA 4404 (pBI 121)	58	50	54.00	
LBA 4404 (pTok 233)	60	48	54.00	
เฉลี่ย	59.00	49.00		ns
F-test			ns	
C.V. (%)				20.95
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2				
LBA 4404 (pBI 121)	25	20	22.50	
LBA 4404 (pTok 233)	24	17	20.50	
เฉลี่ย	24.50	18.50		ns
F-test			ns	
C.V. (%)				19.73
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3				
LBA 4404 (pBI 121)	3	2	2.50	
LBA 4404 (pTok 233)	2	0	1.00	
เฉลี่ย	2.50	1.00		
ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4				
LBA 4404 (pBI 121)	0	0	0	
LBA 4404 (pTok 233)	0	0	0	
เฉลี่ย	0	0		

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

บทที่4

วิจารณ์

1. การศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อการชักนำแคลลัส

จากการทดลองชักนำแคลลัสจากใบเมื่อมีการสร้างแผลด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าการตัดใบเป็นสองส่วน และการเลี้ยงใบทั้งใบ ให้การสร้างแคลลัสได้ดีกว่าการตัด ใบเป็นสามส่วนและการกรีดแผ่นใบ 1 - 3 รอย เป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองของ Goh และคณะ (1988) ซึ่งพบว่าการตัดใบมีการสร้างแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ใบทั้งใบทั้งนี้เนื่องจาก การสร้างแผลกับแผ่นใบส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในใบ แคลลัสที่ได้มีลักษณะสีเขียว เทา เหลือง เกาะตัวกันแน่น ถึงแม้ว่าการเลี้ยงใบทั้งใบให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้น้อยกว่าแต่แคลลัสที่ได้มีการพัฒนาและเจริญได้เร็วกว่า แคลลัสมีลักษณะเกาะตัวกันแน่น และมีสีเขียวมากกว่า อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบการชักนำการสร้างเมอริสเต็มโนดูลแคลลัสและยอดจากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนดังกล่าว การสร้างแคลลัสส่วนใหญ่สร้างจากด้านที่อยู่ใกล้กับโคนใบมากกว่าด้านปลายใบ เป็นไปในทำนองเดียวกันในทุกหน่วยการทดลอง (ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2) และจากการกรีดแผ่นใบเพื่อศึกษาการสร้างแคลลัส พบว่าการกรีดแผ่นใบ 1 -2 รอย ให้การสร้างแคลลัสได้ดีกว่าการกรีดใบ 3 รอย แต่ยังสร้างแคลลัสได้น้อยกว่าการใช้ใบทั้งใบ และการตัดใบ แบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง สำหรับตำแหน่งแคลลัสในกรณีการกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบมีการสร้างแคลลัสจากเส้นกลางใบบริเวณรอยกรีดทั้งด้านโคนและปลายใบ เมื่อมีการย้ายเลี้ยงพบว่าแคลลัสที่สร้างจากด้านโคนใบของทุกชิ้นส่วนมีการพัฒนาและเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าแคลลัสด้านปลายใบ Techato (1997) ได้รายงานผลของชิ้นส่วนใบต่อการสร้างโนดูลาแคลลัสมังคุด ว่าการเลี้ยงใบทั้งใบสามารถสร้างโนดูลาแคลลัสได้สูงกว่าการตัดแบ่งใบเป็นสามส่วนตามขวางและการกรีดแผ่นใบผ่านเส้นกลางใบ โนดูลาแคลลัสสามารถสร้างได้ดีจากด้านโคนใบและบริเวณเนื้อเยื่อมีโซฟิลล์ของแผ่นใบ ส่วนการกรีดแผ่นใบพบว่ามีการสร้างโนดูลาแคลลัสได้เฉพาะบริเวณรอยกรีดด้านโคนใบและปลายใบของเส้นกลางใบเท่านั้น ธิดารัตน์ น้อยรักษา (2535) รายงานในทำนองเดียวกันว่าการกรีดใบตัดเส้นกลางใบเป็น 3 รอย และการตัดใบเป็นสามส่วน ให้การสร้างแคลลัสลักษณะเป็นฟองฟูมากกว่าการกรีดเพียง 1 - 2 รอย แต่แคลลัสที่พัฒนาเป็นแคลลัสที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณและชักนำพืชต้นใหม่ได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลาต่อมา จากการทดลองการเตรียมใบแบบต่าง ๆ มีผลต่อการสร้างแคลลัสได้ต่างกันดังนั้นในการเตรียมใบมังคุดเพื่อใช้ในการศึกษาการปลูกถ่ายยีนจึงเลือกการใช้ใบทั้งใบ การตัดใบเป็นสองส่วน และการกรีดแผ่นใบ 1-2 รอย และแม้ว่าวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบโดยการกรีดซึ่งเป็นวิธีการสุดท้ายให้เปอร์เซ็นต์

การสร้างแคลลัสได้น้อยก็ตามแต่วิธีการสร้างแผลดังกล่าวอาจส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนให้ประสบผลสำเร็จได้

2. การศึกษาความเข้มข้นของซีโฟทาซิมต่อการสร้างแคลลัสและการสร้างยอด

จากการศึกษาการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างแคลลัส เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 3.1) พบว่าใบที่วางเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซิมสามารถสร้างแคลลัสได้สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติมซีโฟทาซิม 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) และซีโฟทาซิมทุกระดับไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัสจากใบ เช่นเดียวกับการทดลองของ Shackelford และ Chlan (1996) ที่ทำการคัดเลือกประสิทธิภาพสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* โดยใช้ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าซีโฟทาซิมมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้สูงสุด ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการสร้างแคลลัสของใบยาสูบความสามารถในการสร้างแคลลัสจากใบยาสูบในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิมไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามซีโฟทาซิมมีผลกระทบต่อการสร้างยอดของแคลลัส ส่วนการทดลองของ Savela และ Uosukainen (1996) ได้ทำการศึกษาการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อนในภาชนะที่เพาะเลี้ยงแอปเปิ้ลพันธุ์ YP พบว่าการกำจัดเชื้อดังกล่าวสามารถใช้ซีโฟทาซิมได้ตั้งแต่ 250-1500 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการทดลองของ Lowe และคณะ (1993) สามารถใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อส่วนเกินในการปลูกถ่ายยีนในเบญจมาศ ในทำนองเดียวกับการทดลองของ Sarma และคณะ (1995) ที่ทดลองผลของคาร์เบนนิซิลินและซีโฟทาซิมต่อกระบวนการเอมบริโอเจนีซีสใน Sitka spruce พบว่าซีโฟทาซิมไม่มีผลต่อกระบวนการดังกล่าว Manthias และ Mukasa (1987) พบว่าซีโฟทาซิมมีส่วนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ซีโฟทาซิมสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์และมีผลต่อการพัฒนาการของเซลล์ได้เพียงระยะหนึ่งเท่านั้น จากการบันทึกผลตลอดระยะการทดลองพบว่าซีโฟทาซิมมีผลกระทบระยะยาวต่อการพัฒนาการของเซลล์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ทำให้การทดลองที่ได้มีความแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นของซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการสร้างแคลลัสจากใบซึ่งใบสามารถสร้างแคลล้สได้น้อย มีอาการใบไหม้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีผลกระทบต่อการสร้างแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นยอดของโนดูลาแคลลัสของใบมังคุด ส่วนลักษณะและสีของแคลลัส ไม่มีความแตกต่างกัน เป็นลักษณะชนิดเกาะตัวกันแน่น สีเขียวอมเหลืองจากการเลี้ยงต่อไป 3-4 เดือนการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณของแคลลัสเริ่มแตกต่างกัน จนส่งผลให้การพัฒนาเป็นต้นได้น้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ (รูปที่ 6)

สำหรับการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบวางเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากใบ เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าระดับความเข้มข้นของซีโฟทาซิม 0, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลกระทบต่อการชักนำยอดโดยตรงจากใบ และพบว่าระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลกระตุ้นการพัฒนาการของเซลล์ซึ่งทำให้ใบมีการสร้างยอดได้ดีกว่าการไม่เติมซีโฟทาซิม เช่นเดียวกับการทดลองของ Manthias และ Mukasa (1987) ที่ศึกษาผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างแคลลัสและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในข้าวบาร์เลย์ ส่วนซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การสร้างยอดโดยตรงจากใบลดลงแตกต่างกันทางสถิติให้จำนวนใบไหม้สูงกว่าความเข้มข้นที่ต่ำกว่า และยังพบว่าการใช้ซีโฟทาซิมชักนำยอดโดยตรงจากใบให้ผลตรงกันข้ามกับการชักนำยอดโดยผ่านโนดูลาแคลลัส ซึ่งการชักนำยอดโดยตรงจากใบซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลกระทบต่อการพัฒนาการของการแบ่งเซลล์ในระยะแรก ทำให้การสร้างยอดโดยตรงจากใบลดลง แต่หลังจากชักนำยอดโดยตรงจากใบได้แล้วพบว่ายอดดังกล่าวมีการพัฒนาเป็นต้นได้ปกติเช่นเดียวกันทุกระดับความเข้มข้น ในขณะซีโฟทาซิมไม่มีผลต่อการชักนำยอดโดยผ่านโนดูลาแคลลัสในระยะแรกแต่หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน การพัฒนาของแคลลัสลดลงแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดและสามารถชักนำยอดได้เพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ทั้งนี้เป็นไปได้ที่การชักนำยอดโดยตรงจากใบทำให้ยอดที่ได้ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเป็นตายอดและยอดในระยะเวลาที่สั้นเพียง 1 เดือนเท่านั้น และเซลล์ดังกล่าวเปลี่ยนไปเป็นยอดได้ทันทีหลังจากการพัฒนาไปเป็นยอดแล้วสามารถเจริญอยู่บนอาหารดังกล่าวได้ปกติ ในขณะที่การสร้างยอดโดยผ่านโนดูลาแคลลัสหลังจากได้รับการกระตุ้นให้มีการสร้างแคลลัสแล้วต่อไปเป็นช่วงที่ชักนำยอดซึ่งใช้เวลา 3-4 เดือน ช่วงดังกล่าวเซลล์ได้รับผลกระทบจากซีโฟทาซิม และเป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นระบบของเนื้อเยื่อเพื่อทำหน้าที่อื่นซึ่งใช้ระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงยาวกว่า (อมรา คัมภิรานนท์, 2536) ทำให้สามารถพัฒนาการไปเป็นต้นได้น้อย (รูปที่ 7)

3. การศึกษาวิธีการปลูกถ่ายยีนกับใบมังคุด

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของคานามัยซินที่เหมาะต่อการคัดเลือกแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาความเข้มข้นของคานามัยซินต่อการคัดเลือกแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ใบทั้งใบเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าเริ่มมีการสร้างแคลลัสหลังปลูกถ่ายยีนได้ 19 วัน และทุกระดับความเข้มข้นของคานามัยซิน (0, 50, 100, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความสามารถสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทั้งการเลี้ยงร่วมและไม่เลี้ยงร่วม แต่มีแนวโน้มว่าใบที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อสร้างแคลลัสได้สูง เนื่องจากความต้านทานต่อคานามัยซินถูกชักนำจากเซลล์ที่อยู่รอบนอกที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนและชิ้นส่วนของใบมังคุดมี

ความสามารถต้านทานต่อคานามัยซินได้ระดับหนึ่ง แต่หลังจากการปลูกถ่ายยีนได้ 3 เดือน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อบนอาหารที่เติมคานามัยซินระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติกับที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อ และหลังจากย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำยอดและคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน พบว่ามีแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงการทดลองเดียว 2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ใบที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียไม่มีแคลลัสรอดชีวิต เช่นเดียวกับการทดลองของ Norelli และคณะ (1994) ที่ทำการปลูกถ่ายยีนในแอปเปิ้ล พบว่าสามารถคัดเลือกชิ้นส่วนของใบหลังการปลูกถ่ายยีน โดยใช้อาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร Nishibayashi และคณะ (1996) พบว่าระดับความเข้มข้นของคานามัยซิน 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นเหนือใบเลี้ยงของแตงกวา Pena และคณะ (1995) รายงานในส้มว่าความเข้มข้นของคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะต่อการคัดเลือกชิ้นส่วนต้นอ่อนของส้มมากที่สุด เพื่อเพิ่มความมั่นใจในความต้านทานต่อคานามัยซินเขาได้เพิ่มความเข้มข้นของคานามัยซินทุกช่วง 25 - 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการย้ายเลี้ยงแต่ละครั้ง ทำให้คัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนได้ดียิ่งขึ้น ส่วน Stephen และคณะ (1994) รายงานการปลูกถ่ายยีนใบโกโก้โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ A 281 ที่มีพลาสมิด pGpTV พบว่าสามารถคัดเลือกชิ้นส่วนบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เพิ่มขึ้นครั้งละ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการย้ายเลี้ยง Rashid และคณะ (1996) พบว่าระดับความเข้มข้นของคานามัยซินที่เหมาะต่อการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบและลำต้นของ *Moricandia arvensis* คือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร Karthikeyan และคณะ (1996) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในแคลลัสถั่ว *Vigna mungo* พบว่าหลังจากคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนแล้วสามารถวางเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวบนอาหารที่เติมคานามัยซินได้ถึง 900 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นไปในทำนองเดียวกับการรายงานโดย Lowe และ คณะ (1993) ในเบญจมาศว่าชิ้นส่วนที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซินสูงถึง 10 เท่า Blay และ Oakes (1996) ศึกษาระดับความเข้มข้นคานามัยซิน 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการปลูกถ่ายยีนกับใบเลี้ยงและลำต้นเหนือใบเลี้ยงของ *Solanum gilo* พบว่าการใช้คานามัยซินระดับความเข้มข้นต่ำเหมาะต่อการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนในใบเลี้ยงและระดับความเข้มข้นสูงเหมาะต่อการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นเหนือใบเลี้ยง จากการทดลองที่กล่าวมาเป็นตัวชี้ให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของคานามัยซินที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ ชนิดของพืช และชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการปลูกถ่ายยีน ซึ่งเซลล์ของพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการปลูกถ่ายยีนและทนต่อระดับความเข้มข้นของคานามัยซินได้ต่างกัน

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ระดับความเข้มข้นของคานามัยซิน 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะต่อการคัดเลือกชิ้นส่วนหลังการปลูกถ่ายยีนมากที่สุด ถึงแม้ว่าการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบก็ตาม เซลล์พืชอาจสูญเสียความต้านทานต่อคานามัยซินได้ เนื่องจากความต้านทานต่อคานามัยซินมักเกิดจากเซลล์รอบๆ เนื้อเยื่อ และคานามัยซินสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์พืชได้โดยการแพร่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เท่านั้นและสามารถเคลื่อนย้ายได้เพียงระยะสั้นเท่านั้น (Wilmink and Dons, 1993) ส่วนการส่ง T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียพบว่าสามารถส่งเข้าสู่พืชได้บริเวณบาดแผลหรือรอยตัดรอบๆ ชิ้นส่วนพืชตลอดจนเซลล์มัดท่อน้ำท่ออาหาร (Pena, *et al.*,1995; Lowe, *et al.*, 1993) Wilmink และ Dons (1993) ยังพบอีกว่าคานามัยซินที่ใช้สามารถรวมตัวหรือจับตัวได้ดีกับเจลไรท์ และอิออนที่เป็นไบวาเลนท์ของแคลเซียมและ แมกนีเซียม ในสภาพที่มี pH ต่ำกว่า 6 ในขณะที่สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมี pH 5.7-5.8 ดังนั้นการเพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกความต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนอาจเพิ่มระดับความเข้นข้นให้สูงขึ้นได้หรือควรใช้วุ้นแทนการใช้เจลไรท์

3.2. การศึกษาสายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาการใช้สายเชื้อ 3 สายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่างกัน 3 เวลา พบว่าหลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 1 เดือน ใบที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่างกัน สามารถสร้างแคลลัสได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสายเชื้อ LBA 4404 ที่มี pBI 221 มีแนวโนม้ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่าหน่วยทดลองอื่น เช่นเดียวกับการทดลองของ Jong และคณะ (1993) พบว่าการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด p35GUSINT ที่มีความรุนแรงสามารถปลูกถ่ายยีนได้สูง McAfee และคณะ (1993) ในการศึกษาการชักนำรากใน pine (*Pinus*), larch (*Larix*) โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A4 และ R1000 พบว่าสายเชื้อ A4 สามารถปลูกถ่ายยีนได้ดีกว่าการใช้สายเชื้อ R1000 ต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีการสร้างรากและคุณภาพของรากดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายยีน ส่วนการทดลอง Lowe และคณะ (1993) ได้ศึกษาปัจจัยบางประการต่อการปลูกถ่ายยีนและการเจริญเป็นต้นใหม่ของเบญจมาศ พบว่าสายเชื้อทั้ง 17 สายเชื้อมีผลต่อการสร้างแคลลัสของใบ แคลลัสที่ได้ไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้ในการปลูกถ่ายยีนได้ เนื่องจากยังไม่ได้ต้นที่สมบูรณ์และยังไม่พบกิจกรรมของ GUS ได้เพียงแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเท่านั้น และยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ส่วนเวลาในการอินคิวเบทที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนคือ 12-16 ชั่วโมง Benjamin และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการใช้สายเชื้อ 3 สายเชื้อในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของ *Rauvolfia serpentina* พบว่ามีเพียง *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ 15434 เท่านั้นที่สามารถปลูกถ่ายยีนได้ ทำให้ได้รากขนอ่อนจำนวนมาก ส่วนเวลาที่เหมาะสมในการอินคิวเบทคือ 72 ชั่วโมง สำหรับเวลาในการ

อินคิวเบท 48 ชั่วโมง พบว่ามีแนวโน้มในการให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนสูงสุด เช่นเดียวกับการทดลองของ Norelli และคณะ (1994) พบว่าการอินคิวเบทเชื้อเวลา 18 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะในการปลูกถ่ายยีนกับแอปเปิ้ลพันธุ์ Malling 26 ให้ต้านทานต่อเชื้อ *Erwinia amylovora* จากกการทดลองของ Raharjo และคณะ (1996) พบว่าการอินคิวเบทเชื้อเป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง เหมาะในการปลูกถ่ายยีนในแตงกวาซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองครั้งนี้แม้ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ยังไม่พบ จึงไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้ชัดได้ว่ายีนดังกล่าวถูกส่งเข้าไปยังเซลล์ของมังคุดได้ การทดลองดังกล่าวจึงอาศัยความต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายเป็นตัวตรวจสอบเบื้องต้น และจากการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมาพบว่าความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ หลายประการ คือ ชนิดของพืช ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วม รวมทั้งชนิดของสายเชื้อ และระยะเวลาในการอินคิวเบท ส่วนระยะเวลาในการอินคิวเบทเชื้อในการทดลองนี้พบว่าการอินคิวเบทเวลา 48 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดมากที่สุด เวลาดังกล่าวการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โครงสร้างของเซลล์และกิจกรรมภายในเซลล์เหมาะต่อการแบ่งเซลล์และการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านหรือพืชอาศัย จากการทดลองได้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีน 2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพัฒนาเป็นกลุ่มตารวมได้ระยะหนึ่ง (รูปที่ 14) แต่กลุ่มตารวมดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้หลังจากเลี้ยงต่อมาอีกระยะหนึ่งกลุ่มตารวมดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีดำและตาย จากการสูญเสียความต้านทานต่อคานามัยซินของเนื้อเยื่อที่ได้หลังการปลูกถ่ายยีน ทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่บนอาหารที่เติมคานามัยซินได้ และการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบอาจเนื่องมาจากโปรโมเตอร์ของยีนไม่มีการทำงานก็ได้ ดังที่มีรายงานโดย Jaziri และคณะ 1994

3.3. การศึกษาสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีน

ผลของความหนาแน่นเชื้อ 3 ระดับต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนพบว่าระดับความหนาแน่นของเชื้อสูงให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้สูงด้วย ระดับความหนาแน่นที่ให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินสูงที่สุดคือ 1.98×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองของ Lin และคณะ (1994) ที่ทำการทดลองการปลูกถ่ายยีนในยาสูบและ *Arabidopsis thalina* พบว่าการใช้ระดับความหนาแน่นของเชื้อสูงขึ้นทำให้ความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนสูงขึ้น ในขณะที่ Pena และคณะ (1994) พบว่าปลูกถ่ายยีนให้ประสิทธิภาพสูงในส้มโดยใช้สายเชื้อที่มีความรุนแรงและความหนาแน่นของเชื้อ $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนความหนาแน่น $4x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ต่ำกว่า จึงเห็นได้ชัดเจนว่าระดับความหนาแน่นที่ใช้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายเชื้อและชนิดของพืช ส่วนการทดลองของ Jong และคณะ (1993) พบว่าการปลูกถ่ายยีนในเบญจมาศด้วย

Agrobacterium tumefaciens สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด p35GUSINT ระดับความหนาแน่นของเชื้อ $5x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ในการปลูกถ่ายยีนมากที่สุด สำหรับการศึกษาการใช้ระดับความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีนในมังคุดครั้งนี้ พบว่าระดับความหนาแน่นมีปฏิสัมพันธ์กับสายเชื้อโดยสายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 221 ให้แคลลัสสูงสุด ถึงแม้ว่าที่ระดับความหนาแน่น $9.90x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI221 ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสน้อยในช่วงแรกก็ตาม แต่หลังจากย้ายเลี้ยงต่อมาจำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเป็นไปในทำนองเดียวกันกับทุกระดับความหนาแน่น แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เมื่อย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำยอดและคัดเลือก 1 เดือน แคลลัสดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาไปเป็นกลุ่มตารวมหรือยอดได้ แคลลัสดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีดำและตาย (ตารางที่ 7 รูปที่ 15)

3.4. ศึกษาวิธีการและเวลาเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

จากการศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วมแตกต่างกันทั้ง 4 วิธี พบว่าใบให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที จึงกำจัดเชื้อ มีแนวโน้มการสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่าในระยะแรก แต่หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 พบว่าการเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 10 นาทีและเลี้ยงร่วมต่อบนอาหารสูตร 1.2 อีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้สูงสุด (ตารางที่ 8 รูปที่ 17) เป็นไปในทำนองเดียวกันกับทดลองของ Pena และคณะ (1995) พบว่าการเลี้ยงร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เหมาะต่อการปลูกถ่ายยีนในส้ม จากการทดลองของ Sangwan และคณะ (1991) พบว่าการศึกษาถึงผลของสภาพวางเลี้ยงต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนสู่ลำโพง (*Datura*) โดยใช้เวลาในการเลี้ยงร่วม 2,3 และ 4 วัน พบว่าการเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 และ 2 วัน ให้ชิ้นส่วนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนได้ไม่แตกต่างกัน การเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 4 วัน ให้ชิ้นส่วนที่มีความต้านทานน้อยที่สุด และเขายังพบว่าวิธีการใช้ชิ้นส่วนหลังเตรียมเลี้ยงร่วมกับเชื้อทันทีประสบผลสำเร็จสูงกว่าวิธีการวางเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารเลี้ยงปกติ (precultivation) ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ การศึกษาถึงวิธีการต่างๆ ในการเลี้ยงร่วมและระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออาจมีความแตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ และชนิดของสายเชื้อ แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที และวางเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร 1.2 อีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อที่อ่อนแอหรือกำจัดไม่หมดมีโอกาสทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อบนชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงได้อีกครั้งหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากการซีโฟทาซิมที่ใช้ในการกำจัดเชื้อได้ลดความเข้มข้นลงทำให้เชื้อเจริญได้อีกครั้งหนึ่ง และพบว่าการกำจัดเชื้อหลายครั้งทำให้มีผลโดยตรงต่อชิ้นส่วนพืช และเซลล์บางส่วนที่คาดว่าได้รับการปลูกถ่ายยีนแล้วอาจเกิดความเสียหายจากการสัมผัสกับระดับความเข้มข้นของซีโฟทาซิมใหม่ได้ ถึงแม้ว่าจากการทดลองการใช้สารปฏิชีวนะระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลในระยะแรกก็จริง แต่การได้รับ

ความเข้มข้นใหม่หลายครั้งส่งผลให้ชิ้นส่วนของใบมังคุดมีลักษณะไหม้เพิ่มขึ้น ดังนั้นการกำจัดเชื้อหลังการเลี้ยงร่วมอาจใช้ระดับความเข้มข้นของซีโฟทาซิมสูงขึ้นได้เพื่อการกำจัดเชื้อให้หมดภายในครั้งเดียว

3.5. ศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบและชิ้นส่วนใบมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ผลการสร้างแผลกับแผ่นใบแบบต่าง ๆ และการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาทีต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ พบว่าการไม่ใช้และการใช้อัลตราโซนิค ให้การสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 9) แต่มีแนวโน้มว่าการไม่ใช้สามารถสร้างแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่า พอสรุปได้ว่าการใช้อัลตราโซนิคที่เวลาดังกล่าวไม่ได้ส่งเสริมการปลูกถ่ายยีน น่าจะใช้ระยะเวลาในการใช้อัลตราโซนิคให้น้อยลงเป็นวินาที ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทดลองระยะเวลาในการใช้อัลตราโซนิค จากการทดลองครั้งแรกได้ศึกษาระยะเวลาการใช้อัลตราโซนิคที่เวลาเดียวกันถึงแม้ผลการทดลองดังกล่าวสร้างแคลลัสได้น้อยก็ตามแต่การทดลองทั้ง 2 การทดลองได้ทำในเวลาใกล้เคียงกันจึงไม่สามารถนำผลการทดลองหนึ่งมากำหนดการใช้กับอีกการทดลองหนึ่งได้ ยังพบว่าการใช้อัลตราโซนิคทำให้การกำจัดเชื้อของอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินได้ง่ายกว่าการไม่ใช้อัลตราโซนิค การใช้อัลตราโซนิคยังมีผลต่อการไหม้ของใบชัดเจน (รูปที่ 18) ส่วนการสร้างแผลกับแผ่นใบทั้ง 4 แบบ พบว่าการสร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงสุด แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเลี้ยงทั้งใบ และการกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-2 รอย (ตารางที่ 9)

ส่วนการใช้ส่วนมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน พบว่าชิ้นส่วนของใบและส่วนของลำต้นอ่อนสามารถให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสหลังปลูกถ่ายยีนได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การใช้ใบอ่อนสีแดงมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงกว่าการใช้ส่วนของลำต้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Sangwan และคณะ (1991) ที่ทดลองผลของการปลูกถ่ายยีนในลำโพง โดยการใช้ชิ้นส่วนของ ลำต้น ก้านใบ และ ราก พบว่าชิ้นส่วนใบให้แคลลัสที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่า ในขณะที่ Lin และคณะ (1994) พบว่าการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของยาสูบประสบผลสำเร็จสูงกว่าการใช้ราก ส่วนการปลูถ่ายยีนในส้มโดย Pena และคณะ (1995a, 1995b) พบว่าการใช้ส่วนของลำต้นมีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนได้สูงที่สุด

การทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของ GUS ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนที่ส่งเข้าสู่เซลล์ของใบมีน้อยความต้านทานดังกล่าวอาจสูญเสียไปได้ ทำให้ชิ้นส่วนดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาการต่อไปได้ อย่างไรก็ตามการสร้างแผลให้กับแผ่นใบก็เป็นวิธีหนึ่งในการส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนให้ประสบผลสำเร็จ ทำให้การส่ง T-DNA ที่อยู่บนพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น (Kingsman and Kingsman, 1988; Kosuge, *et al.*; 1982) เช่นเดียวกับการ

ทดลองของ Norelli และคณะ, (1994) ที่ทำการปลูกถ่ายยีนให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้กับใบอ่อนแอปเปิ้ลโดยการกรีดแผ่นใบ 3-4 รอย พบว่าประสบผลสำเร็จสูงกว่าการใช้ใบทั้งใบที่ไม่มีการสร้างแผลโดยการกรีดแผ่นใบ จากการตรวจกิจกรรมของ GUS ทำให้ยังไม่มีความชัดเจนในการปลูกถ่ายยีนหรือการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่ใบมังคุด จึงอาศัยเพียงยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้การปลูกถ่ายยีนได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนที่ต้านทานต่อคานามัยซินดังกล่าวก็ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ และพบว่าใบของมังคุดเองมีความต้านทานต่อคานามัยซินได้ระดับหนึ่งแม้ไม่ได้มีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อก็ตาม แต่ความต้านทานดังกล่าวแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดกับใบที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนหลังการเลี้ยงร่วม การศึกษาการปลูกถ่ายยีนในมังคุดยังไม่ได้ต้นมังคุดที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนอย่างถาวรเช่นเดียวกับพืชอีกหลายชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องจากมังคุดไม่ใช้พืชอาศัยของอะโกรแบคทีเรียทำให้การทดลองดังกล่าวไม่ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาเป็นต้นได้และมีความแตกต่างจากการทดลองอื่นอยู่บ้างควรมีการใช้สารกระตุ้นการปลูกถ่ายยีนเช่น acetosyringone

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดด้วยอะโกรแบคทีเรีย

1. การสร้างแผลกับแผ่นใบมีผลต่อการชักนำการสร้างแคลลัส การตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวางสร้างแคลลัสได้สูงสุดรองลงมาเป็นการเลี้ยงใบทั้งใบและการกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบ 1 ถึง 2 และ 3 รอย ตามลำดับ

2. ซีโฟทาซิมความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัสจากใบและเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ในการศึกษาการปลูกถ่ายยีนใบมังคุด เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารชักนำยอดโดยตรงมีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการสร้างยอดโดยตรงจากใบ แต่ไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัส

3. ซีโฟทาซิมทุกความเข้มข้นไม่มีผลกระทบต่อการสร้างแคลลัสในระยะแรกของการวางเลี้ยงใบมังคุดหลังการปลูกถ่ายยีน แต่ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลกระทบหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ทำให้การสร้างยอดจากแคลลัสได้น้อย

4. ซีโฟทาซิมที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลกระทบต่อการสร้างยอดโดยตรงจากใบในระยะแรกแต่หลังจากมีการพัฒนาเป็นยอดแล้วพบว่าระดับของซีโฟทาซิมไม่มีผลกระทบต่อการสร้างยอดของใบมงคุด

5. คานามัยซินระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะในการคัดเลือกชิ้นส่วนหลังการปลูกถ่ายยีน

6. อะโกรแบคทีเรียสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 221 มีความเหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนกับใบมังคุดใบมีการสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนได้ดีที่สุด ส่วนเวลาในการอินคิวเบทเชื้อที่เหมาะต่อการปลูกถ่ายยีนคือ 48 ชั่วโมง

7. ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 1.98×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นความหนาแน่นที่เหมาะต่อการใช้ในการเลี้ยงร่วมกับใบมังคุดเพื่อทำการปลูกถ่ายยีนมากที่สุด

8. วิธีการเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายยีนคือ การจุ่มแช่เชื้อเป็นเวลา 10 นาที เลี้ยงร่วมต่ออีก 48 ชั่วโมงจึงทำการกำจัดเชื้อเป็นวิธีการเลี้ยงที่เหมาะต่อการส่งถ่าย T-DNA จากอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ใบมังคุด

9. การศึกษาการสร้างแผลให้กับแผ่นใบ วิธีการตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวางเหมาะต่อการใช้ปลูกถ่ายยีนมากที่สุด

10. การใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาที ไม่เหมาะต่อการส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนใบมังคุด จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงเวลาการใช้ที่เหมาะสมต่อไป

11. การใช้ชิ้นส่วนของใบมังคุดและลำต้นอ่อนไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ชิ้นส่วนทั้ง 2 จึงเหมาะต่อการใช้ในการศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับมังคุดได้ต่อไป ถึงแม้ใบมีแนวโน้มการสร้างแคลลัสได้สูงกว่าก็ตาม

12. การศึกษาการปลูกถ่ายยีนใบมังคุด ยังไม่ได้ต้นมังคุดที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถตรวจได้เพียงยีนเครื่องหมายที่เป็นยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินเท่านั้นและชิ้นส่วนดังกล่าวยังไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ จึงพอสรุปได้ว่าการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดยังไม่ประสบผลสำเร็จเต็มที่

13. มังคุดเป็นพืชที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ดีและอาจไม่ใช้พืชอาศัยของอะโกรแบคทีเรียถึงแม้มังคุดจะเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ก็ตาม เพราะฉนั้นการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดให้ประสบผลสำเร็จจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นเข้าช่วย เช่น การเหนี่ยวนำด้วยสารพวก acetosyringone หรืออาจใช้วิธีการยิงยีน การใช้กระแสไฟฟ้า เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพฯ:กรมป่าไม้.

ธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2533. การขยายพันธุ์มังคุดโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิวัฒน์ พรหมแพทย์. 2532. มังคุดเพื่อการส่งออก. กรุงเทพฯ: ชมรมไม้ผลแห่งประเทศไทย.

มงคล แซ่หลิม. 2531. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการขยายพันธุ์มังคุด. วารสารสงขลานครินทร์ 1:13-17.

สุพัฒน์ อรรถธรรม พิสสวรรณ เจียมสมบัติ ทิพย์วดี อรรถธรรม วิชัย โฆสิตรัตน ธีระ สูตะบุตร เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และ นุชนาถ แซ่อึ้ง. 2535. การสร้างพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานโรคโดยการถ่ายยีน รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 30 วันที่ 29 มกราคม ถึง 1 กุมภาพันธ์ 2535:193-200 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรชัย มัจฉาชีพ. 2528. มังคุด (Mangosteen) *Garcinia mangostana* L. วารสารศูนย์บางพระ 23:15-20.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

อมรา คัมภิรานนท์. 2536. พันธุ์ศาสตร์และผลผลิตทางการเกษตรในอนาคต วารสารวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 11:49-53.

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.

Bassil, N. V., Proebsting, W. M., Moore, L. W. and Lightfoot, D. A. 1991. Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. HortScience 26:1058-1060.

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

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

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.

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

Garfinkel, D. J., and Nester, E. W. 1980. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorgenesis and octopine catabolism. Journal of Bacteriology. 144:732-743.

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.

Jaziri, M., Yoshimatsu, K., Homes, J. and Shimomura, K. 1994. Traits of transgenic *Atrapa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38:257-262.

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

Jordan, M. C., McHughen, A. 1988. Transformation callus does not necessarily regenerate transformaed shoots. Plant Cell Reports 7:285-287.

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

Kingsman, A. J. and Kingsman, S. M. 1988. Genetic Engineering. An Introduction to Gene Analysis and Exploitation in Eukaryotes. Oxfords:Blackwell Scientific.

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.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbour Laboratory

Mathews, H., Bharathan, N., Bhatia, C. R., Litz, R. E., Narayanan, K. R. and Rao, P. 1990. The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladona* L. by acetosyringone. Journal of Plant Physiology 136:404-409.

Mathias, R. J., Mukasa, C. 1987. The effect of cefotaxime on the grown and regeneration of callus from four varieties of barley (Hordeum vulgare). Plant Cell Reports 6:454-457.

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. (Abtract)

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

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

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.

Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., 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.

Petena, L., Sutter, E. G., and Dandekar, A. M. 1988. Root induction by *Agrobacterium* in a difficult-to-root woody species. Acta Horticultural 227:324-329.

Raharjo,S. H. T., Hernandez, M. O., Zhang, Y. Y., Punja, Z. K. 1996 Transformation of pickling cucumber with chitinase-encoding genes using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 15:591-596.

Rashid, H., Toriyama, K., Hinata, K. 1996. Transgenic plant production from leaf discs of *Moricandia arvensis* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 15:799-803

Sangwan, S. R., Ducrocq, C. and Sangwan-Norreel, B. S. 1991. Effect of culture conditions on *Agrobacterium*-mediated transformation in *Datura*. Plant Cell Reports 10:90-93.

Sarma, K. S. Evans, N. E. Selby, C. 1995. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). Journal of Experimental Botany 46:1779-1781.

Savela, M. L. and Uosukainen, M. 1996. Characterization of bacteria contaminating tissue of apple rootstock 'YP'. Journal of Applied Bacteriology 76:368-376.

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

Shen, W. H., Petit, A., Guern, J. and Tempe, J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. Proceedings of the National Academy of Science 85:3417-3421.

Sitbon, F., Edlund, A., Gardestroem, P., Olsson, O. and Sandberg, G. 1993.Compartmentation of indole-3-acetic acid metabolism in protoplasts isolated from leaves of wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants. Planta 191:274-279.

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 Acids Research 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., 1997. Effects of explant types on meristematic nodular callus formation from young leaves of mangosteen. The 14th conference on methodological techniques in biological sciences. December 11, 1997:29-37. Kasetsart University

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.

Wilmink, A and Dons, J. J. M. 1993. Selective agents and marker Genes for use in transformation of monocotyledonous plants. Plant Molecular Biology Reporter 11:165-185

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

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1. องค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงมังคุด

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	MS ดัดแปลง	WPM
1. ธาตุอาหารหลัก .			
NH_4NO_3	1,650.00	1,650.00	400.00
KNO_3	1,900.00	1,900.00	-
KH_2PO_4	170.00	170.00	170.00
$Ca(NO_3)_24H_2O$	-	-	556.00
$CaCl_22H_2O$	440.00	440.00	96.00
$MgSO_47H_2O$	370.00	370.00	-
K_2SO_4	-	-	990.00
2. ธาตุอาหารรอง			
KI	0.83	1.70	-
H_3BO_3	6.20	12.40	6.20
$MnSO_4H_2O$	16.90	33.80	16.90
$ZnSO_47H_2O$	10.60	21.00	8.60
$CuSO_45H_2O$	0.025	0.05	6.25
$Na_2MoO_42H_2O$	0.25	0.50	0.25
$CoCl_26H_2O$	0.025	0.05	-
3. ธาตุเหล็ก			
$FeSO_47H_2O$	27.80	13.90	27.80
Na_2EDTA	37.30	18.60	37.30

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	MS ดัดแปลง	WPM
4. สารอินทรีย์			
Myo-inositol	100.00	500.00	104.10
Nicotinic acid	0.50	0.50	0.50
PyridoxineHCl	0.50	0.50	0.50
ThiamineHCl	0.10	5.00	6.00
Glycine	2.00	2.00	2.00
Sucrose	30,000.00	30,000.00	30,000.00
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต			
ชักนำแคลลัส BA	0.50	-	-
TDZ	0.50	-	-
ชักนำยอด BA	-	5.00	0.10
6. อื่นๆ			
PVP	500.00	-	500.00

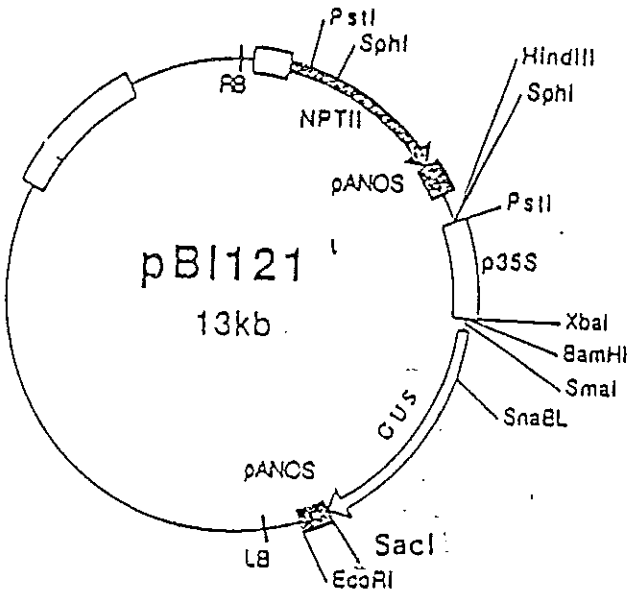
ภาคผนวกที่ 2. องค์ประกอบของสูตรอาหาร YEB สำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

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

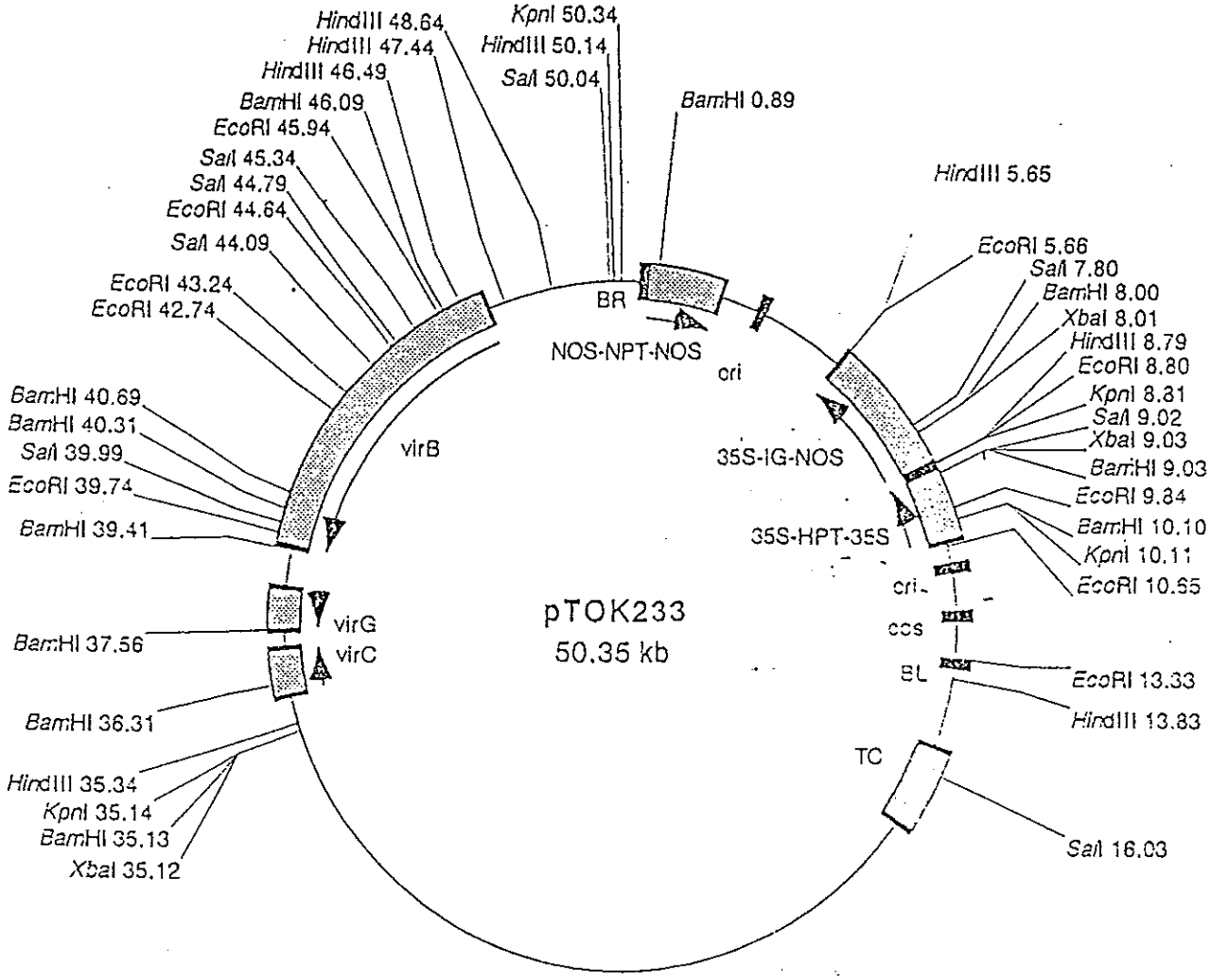
ภาคผนวกที่ 3. องค์ประกอบของสูตรอาหาร AB สำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

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

ภาคผนวกที่ 4 ชนิดและโครงสร้างพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pBI 121 (*Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 และ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13)



ภาคผนวกที่ 5 ชนิดและโครงสร้างพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pTok 233 (*Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404)



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ วิทูล ไชยภักดี

วัน เดือน ปี เกิด 26 ตุลาคม 2504

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
เทคโนโลยีการเกษตรบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	2529

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

พนักงานวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี