บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. สารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกิน กับชิ้นส่วนต่าง ๆ และการชักนำแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหน้าวัววางเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะพบว่าชิ้นส่วนข้อให้อัตราการสร้างแคลลัส ขนาดแคลลัส และจำนวนยอดสูงสูด เนื่องจากชิ้นส่วนข้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีส่วนของตาข้างติดมาด้วยโดยตาข้างเป็นชิ้นส่วนที่มีของเนื้อเยื่อเจริญจำนวนมาก จึงส่งเสริมการพัฒนาการได้ดีกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ ธัญญาพร (2547) ใช้ชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์โซเนตในการเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงสุด และ Vargas และคณะ (2004) ใช้ชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์ Rubrun ในการชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีที่สุดเช่นกัน ในขณะที่ สมปอง และคณะ (2545ข) ใช้ชิ้นส่วนก้านใบในการชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงสุด รองลงมาได้แก่ชิ้นส่วนแผ่นใบ ปลีดอก และจานรองดอก ตามลำดับ

การศึกษานี้ใช้สารปฏิชีวนะร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวพบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 100 มก./ล. มีโลเพนเข้มข้น 10 มก./ล. ให้การพัฒนาเป็นแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมีโลเพนเข้มข้น 10 มก./ล. ให้อัตราการพัฒนาพืชต้นใหม่สูงสุด 14 ยอด ส่วนแวนโคมัยซิน และ ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. ให้การพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ 9 และ 12 ยอด และคานามัยซิน ทุก ความเข้มข้นให้การสร้างแคลลัสและพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ต่ำกว่าสารปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ แม้ว่ามีโลเพนจะให้การพัฒนาพืชต้นใหม่สูงสุดแต่ ให้อัตราการเกิดแคลลัส ขนาดแคลัสต่ำกว่าสารปฏิชีวนะอื่น ๆ และประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อส่วนเกินมีพื้นที่วงกว้างใส ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมน้อยกว่าซีโฟทาซิม ดังนั้นในการศึกษาการกำจัดเชื้อส่วนเกินจึงเลือกใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. เช่นเดียวกับประวีณา และคณะ (2546) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. ในการกำจัดเชื้อส่านเกินจากโปรโตคอร์ม และต้นอ่อนในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้ เอื้องเงิน เอื้องสามสี เอื้องคำ และเอื้องเขาแกะ ทศพร และคณะ (2546) ใช้ซีโฟทาซิม 200 มก./ล. ในการกำจัดเชื้อส่วนเกินจากแคลลัส และต้นในการปลูกถ่ายยีนข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และพืชใบเลี้ยงคู่ เริ่มอรุณ (2541) รายงานการใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. กับแคลลัสมังคุด ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อส่วนเกิน ส่งเสริมการสร้างยอด และยังไม่มี

ผลต่อพัฒนาการของแคลลัส ไม่มีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ Nontaswatsri และคณะ (2004) รายงานการใช้ ซีโฟทาซิมเข้มข้น 250 มก./ล. และแวนโคมัยซิน 400 มก./ล. กับชิ้นส่วนข้อของคาร์เนชั่น เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ส่งเสริมพัฒนาการของแคลลัส ส่วน Yu และคณะ (2001) ได้รายงานการใช้สารปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เช่น คาเบนนิซิลิน และซีโฟทาซิมเข้มข้นสูงถึง 375-500 มก./ล. กับชิ้นส่วนรากมะละกอพบว่า คาเบนนิซิลินส่งเสริมการพัฒนาการของแคลลัสแต่ซีโฟทาซิมยั้บยั้งการพัฒนาของแคลลัส นอกจากนี้ได้มีการใช้สารปฏิชีวนะร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อส่วนเกิน Ieamkhanng และ Chatchawankanphanich (2005) พบว่าการใช้ออกมินทีน และทิมีทินกำจัดเชื้อส่วนเกินจากใบมะเขือเทศส่งเสริมให้ชิ้นใบมีพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้น ตั้งแต่ 200 มก./ล. ขึ้นไปไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อส่วนเกิน ส่วน ซีโฟทาซิมเข้มข้นตั้งแต่ 100 มก./ล. ขึ้นไปยั้บยั้งการพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ และยังมีการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ถึงแม้ว่าใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้นสูงถึง 500 มก./ล. เนื่องจากสารปฏิชีวนะมีผลต่อพัฒนาการของชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ พันธุ์พืช ตลอดจนชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง (สมปอง และคณะ, 2545ก) ดังนั้นในการกำกัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์โซเนตจึงใช้ซีโฟทาซิมซึ่งไม่มีผลต่อพัฒนาการต่าง ๆ จากชิ้นส่วนข้อ Mathias และ Boyd (1986) พบว่าซีโฟทาซิมไม่มีผลการพัฒนาการของเนื้อเยื่อ และชักนำการเกิดยอดในพืชบางชนิด เนื่องจากพืชมีเอนไซม์ esterase ที่ทำหน้าที่ย่อยซีโฟทาซิมแล้วเกิดสาร metabolite บางชนิดทำหน้าที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชได้ นอกจากนี้ Ling และคณะ (1998) รายงานว่าซีโฟทาซิมจัดเป็นสารในกลุ่ม ß-lactams ออกฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีผลยับยั้งการสร้าง ผลังเซลล์ของแบคทีเรียม ระงับกิจกรรมของเอนไซม์ transpeptidases ทำให้ไม่เกิดการ cross-link ของ peptidoglycan ส่งผลให้เกิดการขาดของผลังเซลล์ทำให้เซลล์เกิด osmotic shock ของเซลล์แบคทีเรียม อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ใช้สารปฏิชีวนะตัวอื่นร่วมด้วย การใช้ซีโฟทาซิมเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอสำหรับการกำจัดเชื้อส่วนเกินในการปลูกถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์โซเนต

2. สารปฏิชีวนะคัดเลือก

จากการนำชิ้นส่วนข้อของหน้าวัววางเลี้ยงบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะคัดเลือกไฮโกรมัยซินพบว่า ความเข้มข้นสูง 50 มก./ล. ส่งผลให้ชิ้นส่วนข้อไม่มีอัตราการรอดชีวิต ดังนั้นความเข้มข้น 50 มก./ล. เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสารปฏิชีวนะคัดเลือกกับชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวพันธุ์โซเนตที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน สอดคล้องกับ Chai และคณะ (2004) รายงานการใช้

ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ตรวจสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนในหญ้าสนาม และ ทศพร และคณะ (2546) รายงานการใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. ตรวจสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคัดเลือกในข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับชิ้นส่วนเมล็ดและแคลลัสเช่นกัน ในขณะที่ สุภาวดี (2548) ได้รายงานการใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้นต่ำเพียง 20 มก./ล. คัดเลือกความต้านทานในกล้วยไม้กะเรกะร่อนกับโปรโตคอร์ม ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคัดเลือกของพืชแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์ของพืช (Cruz *et al.,* 2003) ชิ้นส่วนพืช และ ชนิดพืช ทำนองเดียวกับการศึกษา ในคาร์เนชั่น (Zhang *et al.,* 2005) ในมันฝรั่ง (Barrell *et al.,* 2002) ในกุหลาบ (Kim *et al.,* 2004b) และ (Charity *et al.,* 2002) ใน *Pinnus radiata* ส่วน Sugii (1992) พบว่าชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซินไม่มีการพัฒนา หากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ทำให้ชิ้นส่วนพืชตาย Gonzalez และคณะ (1978) อ้างโดย วิไลลักษณ์ (2536) รายงานว่า ไฮโกรมัยซินเป็นสารปฏิชีวนะพวกอะมิโนไซคิลิทอล ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สิ่งมีชีวิตทั้งพวก prokaryotic cells และ eukaryotic cells เนื่องจากไฮโกรมัยซินยับยั้งการสังเคราะห์โฟลีเปปไทด์ในกระบวนการเคลื่อนย้ายเส้นเปปไทด์จากตัวรับไปยังตัวให้ หรือจาก A-site ไปยัง P-site ในกระบวนการสร้างโปรตีนที่ใช้ไรโบโซมทั้งชนิด 70S (เซลล์แบคทีเรีย) และ 80S (เซลล์สัตว์ และเซลล์พืช)

3. ระยะเวลาการจุ่มแช่ และวิธีการเลี้ยงร่วม

จากการศึกษานี้ใช้หน้าวัวพันโซเนตพบว่า ระยะเวลาการจุ่มแช่ชิ้นส่วนข้อเป็นเวลา 15 นาที สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จสามารถตรวจสอบกิจกรรมของ *gus* ได้ แต่สำหรับหน้าวัวพันธุ์ *Alii* และพันธุ์ลูกผสม ‘UH1060’ Chen และคณะ (1997) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCa2Att จุ่มแช่เป็นเวลา 1 วัน กับชิ้นส่วนราก สามารถตรวจสอบกิจกรรมของ *gus* ได้ การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumria และ คณะ (2001) ได้รายงานการใช้เมล็ดข้าวกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTOK233 จุ่มแช่เป็นเวลา 15 นาที สามารถตรวจสอบกิจกการแสดงออกของยีน *gus* ได้ เช่นเดียวกับ Banerjee และคณะ (2006) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ GV2260 ที่มีพลาสมิด *StBEL5* จุ่มแช่เป็นเวลา 15 นาที กับชิ้นส่วนก้านใบมันฝรั่ง สามารถตรวจสอบกิจกรรมของยีน *gus* ได้ สำหรับพืชบางชนิดสามารถตรวจสอบกิจกรรม ของยีน *gus* ได้ เมื่อใช้ระยะเวลาในการจุ่มแช่น้อยเช่น วิทูล (2541) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pIG 121 จุ่มแช่เป็นเวลา 10 นาที กับชิ้นส่วนใบมังคุด สามารถตรวจสอบ

กิจกรรมของยีน *gus* ได้ และ โสภา (2541) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG 121 จุ่มแช่เป็นเวลา 5 นาที กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุก สามารถตรวจสอบกิจกรรมของยีน *gus* ได้ นอกจากนี้ยังมีวิธีการจุ่มแช่ที่ต่างออกไป เช่น Hewezi และคณะ (2002) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pTIBo542 จุ่มแช่ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ใช้ต้นอ่อนทานตะวันสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ ส่วน Sugimura และคณะ (2005) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pIG 121 จุ่มแช่นานถึง 7 วัน กับแคลลัส patchouli จึงตรวจสอบกิจกรรมของ *gus* ได้ ซึ่งระยะเวลาการจุ่มแช่กับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับพันธุ์พืช และชนิดพืช

การวางเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 วัน หลังจากการจุ่มแช่เป็นการปล่อยให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีเวลาสำหรับการส่งถ่ายยีน และยังมีการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมต่ำ เนื่องจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีการสร้างโคโลนีในวันที่ 3 บนอาหาร MMS ส่งผลให้การปลูกถ่ายยีนประสบผลสำเร็จสูงยิ่งขึ้น ทำให้ชิ้นส่วนข้อมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบจุดสีน้ำเงิน 16 จุด สอดคล้องกับ สุภาวดี (2548) ได้วางเลี้ยงชิ้นส่วนโปโตคอร์มในกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ดหลังการจุ่มแช่บนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. ทำให้แคลลัสมีอัตราการรอดชีวิต 94.79 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบกิจกรรมของยีน *gus* พบจุดสีน้ำเงิน 2-3 จุด เช่นเดียวกับ Chai และคณะ (2004) ใช้เอ็มบริโอจินิคแคลลัสหญ้าสนาม (*Agrostis tenuis* Sibth. Fl. Oxen.) จุ่มแช่ และวางเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติมซีโฟทาซิม 200 มก./ล. 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที พบกิจกรรมของยีน *gus* สามารถปลูกถ่ายยีนสำเร็จ 49.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Cortina และ Culianez-Macia (2004) ได้วางเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงมะเขือเทศหลังการจุ่มแช่บนกระดาษกรองบนอาหารสูตร MS 2 วัน สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 12.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ในพืชบางชนิดต้องใช้ระยะเวลาเลี้ยงร่วมนานเพื่อที่ให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมส่งถ่ายยีนได้ เช่น Hoque และคณะ (2005) ได้วางเลี้ยงแคลลัสเอ็มบริโอข้าว บนกระดาษกรองบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 60 เปอร์เซ็นต์ จากตรวจสอบการกิจกรรมของยีน *gus*

ผลสำเร็จในการเลี้ยงร่วม ตัวความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนที่ต่างกันออกไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช พันธุ์พืช และสายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมการรศึกษานี้ยังพบว่า การปนเปื้อนของเชื้อส่วนเกินทำให้ชิ้นส่วนข้อมีพัฒนาการช้า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yu และคณะ (2001) ในมะละกอ

4. ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

จากการศึกษาความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมพบว่า ที่มีค่า OD_{600} =1.634 ทำให้การเกิดแคลลัส 66.67 เปอร์เซ็นต์ และมีพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ 7 ยอด และมีกิจกรรมของยีน *gus* สูงสุด 14 จุด ความเข้มข้นดังกล่าวใกล้เคียงกับการศึกษาของ Clough และ Bent (1998) ซึ่งรายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* มีค่า OD_{600} =1.75 กับโปรโตคอร์ม *Arabidopsis thaliana* ทำให้โปรโตคอร์มมีอัตราการปลูกถ่ายยีนสูงสุด แต่ Sanyal และคณะ (2005) ได้รายงานการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* มีค่า OD_{600}=1 กับเมล็ดของ chickpea ทำให้เมล็ดมีอัตราการรอดชีวิตบนอาหารเติมสารปฏิชีวนะคัดเลือกสูงสุด และพบกิจกรรมของยีน *gus* อย่างไรก็ตาม Chai และคณะ (2002) พบว่า เชื้อ *A. tumefaciens* มีค่า OD_{600} ต่ำเพียง 0.2 ทำให้ โปรโตคอร์มในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ Ozawa และคณะ (2005) พบว่าการประสบความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนในพืชนอกจากชิ้นส่วนพืช พันธุ์พืช ชนิดพืช สารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกิน สารปฏิชีวนะคัดเลือก และระยะเวลาการเลี้ยงร่วม ยังมีชนิดของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และชนิดของสายเชื้อที่ใช้ในการศึกษา เช่น ในข้าว (Iwamoto *et al.,* 2004) ในบรอคโคลี (Gapper *et al.,* 2005) ในฝ้าย (Han *et al.,* 2000) ในส้ม (Cevik *et al.,* 2006) ใน *Atriplex gmelini* (Uchida *et al.,* 2003) และใน *Ageratum conyzoides* (Ditt *et al.,* 2001)

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* เพียงชนิดเดียว ทำให้มีอัตราการปลูกถ่ายยีน 73.33 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สูงเกินไปทำให้ชิ้นส่วนข้อเจริญช้า ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรใช้พืชชนิดอื่นหรือ ความเข้มข้นต่ำที่สามารถให้ผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนใกล้เคียงกันแต่ไม่มีผลต่อพัฒนาการของข้อที่เพาะเลี้ยง