บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

หน้าวัว (*Anthurium* spp.) อยู่ในตระกูล Araceae (Arum Family) เป็นไม้ดอกพื้นเมืองของอเมริกาใต้ไม้ดอกชนิดนี้มีมากมายหลายชนิด จากการสำรวจพบว่า มีประมาณ 1,500 ชนิด (วิเชษฐ, 2540) มีทั้งชนิดไม้ตัดดอก และชนิดไม้กระถาง หน้าวัวมี 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ *Anthurium andraeanum* ส่วนใหญ่ใช้ตัดดอก เป็นที่นิยมในประเทศ และ *A. schzerianum* ปลูกเป็นไม้ตัดดอก และไม้กระถาง เป็นที่นิยมในสหรัฐอเมริกา เช่นหน้าวัวพันธุ์โซเนต เป็นหน้าวัวพันธุ์ต่างประเทศนำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ มีจานรองดอกรูปหัวใจ สีชมพูสดมันเล็กน้อย เมื่อแก่จานรองดอกสีชมพูอมแดง ร่องน้ำตาไม่ลึก หูจานรองดอกชิดกัน ปลีดอกสีชมพูเข้มกว่าจานรองดอกเล็กน้อย (วชิรพงศ์, 2545) ในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกหน้าวัวเป็นการค้าอยู่ 100-120 ไร่ หรือประมาณ 1-1.2 ล้านต้น (8,000-10,000 ต้น/ไร่) (นิรนาม, 2547) ให้ผลผลิตประมาณ 3 ล้านดอก/ปี และคาดว่าการขยายพื้นที่ปลูกหน้าวัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ยังพบปัญหาเกี่ยวกับเรื่องโรค และแมลงเช่น โรคใบแห้ง โรคใบไหม้ โรคใบไหม้จากเชื้อรา โรคแอนแทรกโนส โรคใบด่าง เพลี้ยไฟ เพลี้ยหอย และไร ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิต (เสมอใจ และ โสภิศ, 2548) ปัจจุบันจึงได้นำเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์เช่น การปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืชสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การปลูกถ่ายยีนโดยตรง เช่น การใช้สารเคมี ปืนยิงยีน เข็มฉีดขนาดเล็ก และอีเลคโทรพอเรชัน ส่วนการปลูกถ่ายยีนโดยอ้อมคือการใช้อะโกรแบคทีเรียมซึ่งเป็นเทคนิคการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืช เป็นวิธีเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของพืชตามที่ต้องการโดยวิธีส่งถ่ายพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย สารพันธุกรรมที่ทำการส่งถ่ายเกิดการแทรกเข้าเชื่อมต่อกับโครโมโซมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมาย และเกิดการแสดงออกในลักษณะทางพันธุกรรมที่สารพันธุกรรมเหล่านั้นควบคุม รวมทั้งมีความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมต่อไปยังรุ่นลูกเหมือนในพืชปกติได้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การเข้าทำลายของโรค และแมลง (Watson *et al.,* 1998)

จากการศึกษาชนิดของอะโกรแบคทีเรียมที่มีความสามารถในการส่ง T-DNA (transferred DNA) เข้าสู่พืชมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ *Agrobacterium tumefaciens* มี Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้างปุ่มปมในพืช และ *A. rhizogenes* มี Ri-plasmid (root inducing plasmid) ซึ่งส่งเสริมการสร้างรากลอยในพืช (Kosuge *et al.,* 1992) ปัจจุบันนิยมใช้อะโกรแบคทีเรียมทั้งสองชนิดในการส่งถ่าย T-DNA เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ *Phalaenopsis* (Chai *et al.,* 2002) ตำเลีย (สมัชชา และสมปอง 2544) ยางพารา (ชวนพิศ, 2544) มังคุด (เริ่มอรุณ,2541) โกโก้ (Mayolo *et al.,* 2003) ยาสูบ (Hong *et al.,* 2005) กุหลาบ (Kim *et al.,* 2004b) และปอชวา (Herath *et al.,* 2005) เป็นต้น ดังนั้นการปลูกถ่ายยีนเพื่อแก้ปัญหาเรื่องโรค แมลง และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาพันธุ์หน้าวัว อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายยีนโดยผ่านอะโกรแบคทีเรียมอาจจะมีความจำเพาะสำหรับพืชแต่ละชนิด ดังนั้นการศึกษาการปลูกถ่ายยีนในหน้าวัวจึงเป็นสิ่งจำเป็น ในหน้าวัวมีรายงานการปลูกถ่ายยีนในหน้าวัวพันธุ์ *Alii* และ พันธุ์ลูกผสม 'UH1060' โดยใช้ชิ้นส่วนรากเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 (Chen *et al.,* 1997) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหน้าวัวร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* ดังนั้นในรายงานนี้จะได้ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะคัดเลือก และวิธีการเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ EHA 105 (ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มีเครื่องหมายต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน และ *gus* เป็นยีนรายงานผล) เพื่อเป็นแนวทางปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนต่าง ๆ รวมทั้งข้อของหน้าวัวพันธุ์โซเนตต่อไป

การตรวจเอกสาร

การขยายพันธุ์หน้าวัวด้วยเทคนิคเทคโนโลยีชีวภาพประสบความสำเร็จจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และข้อ สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร Murashige and Skoog ดัดแปลง (MMS) เติม TDZ (thidiazuron) เข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA (N^6-benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มก./ล. ส่วนสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นสูง 825 มก./ล. ชักนำการเกิดแคลลัส หากใช้ความเข้มข้นต่ำ 206 มก./ล. ชักนำการเกิดต้น (สมปอง และคณะ 2545ก, ธัญญาพร, 2547) นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีที่สามารถผลิตต้นได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นแล้วยังสามารถผลิตพืชปลอดโรค ปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตยา และสารเคมีจากพืช การเก็บรักษาพันธุกรรมของพันธุ์พืช เป็นต้น (Pierik *et al*., 1974)

การปลูกถ่ายยีนประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ สำหรับการศึกษาการปลูกถ่ายยีน ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ชนิดของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อส่วนเกิน

การใช้สารปฏิชีวนะในการปลูกถ่ายยีนนั้นมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญคือ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และเพื่อส่งเสริมพัฒนาการของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับ ชิ้นส่วน พันธุ์พืช และ ชนิดพืช สารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกินที่นิยมใช้ส่วนใหญ่คือ ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200-500 มก./ล. เช่น สุภาวดี (2548) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากโปรโตคอร์มในกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด เช่นเดียวกับ ประวีณา และคณะ (2546) ใช้กำจัดเชื้อส่านเกินจากโปรโตคอร์ม และต้นอ่อนในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้เอื้องเงิน เอื้องสามสี เอื้องคำ และเอื้องเขาแกะ ทศพร และคณะ (2546) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากแคลลัส และต้นในข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 Girard และคณะ (2004) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากแคลลัสในยาสูบ และ วิทูล (2541) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงในมังคุด ส่วน Hoque และคณะ (2005) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 250 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากแคลลัสในข้าว เช่นเดียวกับ Chai และคณะ (2004) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากเอ็มบริโอจินิคแคลลัสในหญ้าสนาม (*Agrostis tenuis* Sibth. FI. Oxen.) Wang และ Ge (2004) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากเอ็มบริโอจินิคแคลลัสในหญ้าเลี้ยงสัตว์ (*Festuca arundinacea*) Chen และคณะ (1997) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนรากในหน้าวัว พันธุ์ *Alii* และพันธุ์ลูกผสม ‘UH1060’ รัชนก และคณะ (2548) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากโปรโตคอร์มในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ “เอียสกุล” Men และคณะ (2003) ใช้กำจัดเชื้อส่านเกินจากโปรโตคอร์มในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Banerjee และคณะ (2006) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนก้านใบเลี้ยงในมันฝรั่ง Cruz และคณะ (2003) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงใน annatto สองพันธุ์ คือ Peruana และ Criolla Kim และคณะ (2004a) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 300 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากเซลล์ซัสเพนชั่นในยาสูบ Sugimura และคณะ (2005) ใช้กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงใน patchouli Cortina และ Culianez-Macia (2004) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 400 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงในมะเขือเทศ Zhang และคณะ (2005) ใช้ซีโฟทาซิมเข้มข้น 500 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนใบในคาร์เนชั่น การกำจัดเชื้อส่วนเกินจากการปลูกถ่ายยีนนอกจากสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิมยังมีสารปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เช่น Supartana และคณะ (2005) ใช้สเตรบโทมัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. และไรฟามพิซินเข้มข้น 10 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากเมล็ดในข้าว Cho และ Widholm (2002) ใช้ไทมีนทีนเข้มข้น 200 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงในถั่ว Hewezi และคณะ (2002) ใช้ออกมีนทินเข้มข้น 500 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากชิ้นส่วนใบเลี้ยง และต้นอ่อนในทานตะวัน Taskin และคณะ (2003) ใช้ออกมีนทินเข้มข้น 400 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจาก

ชิ้นส่วนต้นอ่อนใน *Arabis gunnisoniana* Nagamiya และ Takabe (2003) ใช้คาเบนนิซิลลินเข้มข้น 500 มก./ล. กำจัดเชื้อส่วนเกินจากแคลลัสใน *Atriplex*

ระยะเวลาการจุ่มแช่ และวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ระยะเวลาการจุ่มแช่ และวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การปลูกถ่ายยีนประสบผลสำเร็จซึ่ง ระยะเวลาการจุ่มแช่ที่นิยมใช้ในการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลาตั้งแต่ 3 นาที ถึง 72 ชั่วโมง และวิธีการเลี้ยงร่วมมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับ ชิ้นส่วนพืช พันธุ์พืช ชนิดพืช และสายของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่เช่น Hewezi และคณะ (2002) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pTIBo542 3 นาที กับต้นอ่อนเลี้ยงร่วม 3 วัน บนกระดาษกรองบนอาหาร MS (Murashige และ Skoog) ในการปลูกถ่ายยีนทานตะวัน Sugimura และคณะ (2005) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pIG 121-Hm และสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 PaCP เป็นเวลา 10 นาที กับชิ้นส่วนใบเลี้ยงร่วม 3 วัน ในการปลูกถ่ายยีน patchouli Wang และ Ge (2005) จุ่มแช่แชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305 เป็นเวลา 20 นาที กับชิ้นส่วนเอ็มบริโอจินิคแคลลัส เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 2 วัน บนกระดาษกรองบนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีนหญ้าอาหารสัตว์ (*Festuca arundinacea*) รัชนก และคณะ (2548) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นเวลา 30 นาที กับชิ้นส่วนโปรโตคอร์ม เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 2 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหาร VW (Vacin และ Went) ในการปลูกถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ “เอียสกุล” Men และคณะ (2003) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ AGL1 และ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นเวลา 30 นาที กับโปรโตคอร์มเลี้ยงร่วม 2 วัน บนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้ *Dendrobium* ทศพร และคณะ (2546) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และสายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 เป็นเวลา 30 นาที กับแคลลัส เลี้ยงร่วม 3 วัน บนอาหาร N_6 ในการปลูกถ่ายยีนข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 Cho และ Widholm (2002) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pBIN*m-gfp5*-ER เป็นเวลา 30 นาที กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง เลี้ยงร่วม 3 วัน บนกระดาษกรองบนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีนถั่วหลือง Nagamiya และ Takabe (2003) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ C58 ที่มีพลาสมิด pBI121 เป็นเวลา 30 นาที กับแคลลัส เลี้ยงร่วมบนกระดาษกรองเป็นเวลา 3 วัน ในการปลูกถ่ายยีน *Atriplex* Cruz และคณะ (2003) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 2301 เป็นเวลา 30 นาที กับชิ้นส่วน

ลำต้นเหนือใบเลี้ยง เลี้ยงร่วม 3 วัน บนกระดาษกรองบนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีนใน annatto สองพันธุ์ คือ Peruana และ Criolla สุภาวดี (2548) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง กับโปรโตคอร์ม เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 2 วัน เลี้ยงบนอาหาร VW ในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด Cortina และ Culianez-Macia (2004) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBin 19 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กับชิ้นส่วนใบเลี้ยง เลี้ยงร่วม 2 วัน บนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีนมะเขือเทศ Kim และคณะ (2004a) เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด hGM-CSF เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กับแคลลัส เลี้ยงร่วม 2 วัน บนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีนยาสูบ Koroch และคณะ (2002) จุ่มแช่เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pBISN1 เป็นเวลา 30 นาที กับชิ้นส่วนใบเลี้ยง เลี้ยงร่วม 3 วัน บนอาหาร MS ในการปลูกถ่ายยีน *Echinacea purpurea*

ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคัดเลือก

สารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกยีนกับยีนที่อยู่ในพลาสมิดโดยส่วนใหญ่ใช้คานามัยซิน หรือไฮโกรมัยซิน ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคัดเลือกหลังการปลูกถ่ายยีนขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืช พันธุ์พืช ชนิดพืช ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือกที่นิยมใช้มีความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 1.25-300 มก./ล. เช่น Nagamiya และ Takabe (2003) ใช้คานามัยซินเข้มข้น 1.25 มก./ล. คัดเลือกแคลลัสในการปลูกถ่ายยีน *Atriplex* Cruz และคณะ (2003) ใช้คานามัยซินเข้มข้น 2.5 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงในการปลูกถ่ายยีน annatto สองพันธุ์ คือ Peruana และ Criolla Chen และคณะ (1997) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนรากในการปลูกถ่ายยีนหน้าวัวพันธุ์ *Alii* และพันธุ์ลูกผสม 'UH1060' ประวีณา และคณะ (2546) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกโปรโตคอร์มในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้เอื้องเงิน เอื้องสามสี เอื้องคำ และเอื้องเขาแกะ ทศพร และคณะ (2546) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกแคลลัส และต้นอ่อน ในการปลูกถ่ายยีนข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 Supartana และคณะ (2005) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกเมล็ดในการปลูกถ่ายยีนข้าว Chai และคณะ (2004) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกเอ็มบริโอจินิคแคลลัส ในการปลูกถ่ายยีนหญ้าสนาม (*Agrostis tenuis* Sibth. FI. Oxen.) Banerjee และคณะ (2006) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนก้านใบเลี้ยงในการปลูกถ่ายยีนมันฝรั่ง Hewezi และคณะ (2002) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนต้นอ่อนในการปลูกถ่ายยีนทานตะวัน Girard และคณะ (2004) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกแคลลัสในการปลูกถ่ายยีนยาสูบ Koroch และคณะ (2002) ใช้คานามัยซินเข้นข้น

50 มก./ล. คัดเลือกในการปลูกถ่ายยีนใบเลี้ยง *Echinacea purpurea* Taskin และคณะ (2003) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนต้นอ่อนในการปลูกถ่ายยีน *Arabis gunnisoniana* โสภา (2541) ใช้คานามัยซินเข้นข้น 50 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงในการปลูกถ่ายยีนในส้มจุก Cho และ Widholm (2002) ใช้คานามัยซินเข้มข้น 75 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงในการปลูกถ่ายยีนถั่วเหลือง Cortina และ Culianez-Macia (2004) ใช้คานามัยซินเข้มข้น 100 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนใบเลี้ยงในการปลูกถ่ายยีนมะเขือเทศ Kim และคณะ (2004a) ใช้คานามัยซินเข้มข้น 200 มก./ล. คัดเลือกเซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัส ในการปลูกถ่ายยีนยาสูบ Robinson และ Firoozabady (1993) ใช้คานามัยซินเข้มข้น 300 มก./ล. คัดเลือกเอ็มบริโอจินิกแคลลัส ในการปลูกถ่ายยีนกุหลาบ ส่วน สุภาวดี (2548) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20 มก./ล. คัดเลือกโปรโตคอร์ม ในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด รัชนก และคณะ (2548) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 30 มก./ล. คัดเลือกโปรโตคอร์มในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ “เอียสกุล” Men และคณะ (2003) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 30 มก./ล. คัดเลือกโปรโตคอร์มในการปลูกถ่ายยีนกล้วยไม้ *Dendrobium* Hoque และคณะ (2005) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. คัดเลือกแคลลัสในการปลูกถ่ายยีนข้าว Sugimura และคณะ (2005) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. คัดเลือกชิ้นส่วนใบในการปลูกถ่ายยีน patchouli Wang และ Ge (2005) ใช้ไฮโกรมัยซินเข้มข้น 250 มก./ล. คัดเลือกเอ็มบริโอจินิคแคลลัสในการปลูกถ่ายยีนหญ้าอาหารเลี้ยงสัตว์ (*Festuca arundinac)* นอกจากสารปฏิชีวนะคัดเลือก คานามัยซินหรือไฮโกรมัยซิน ยังมีการใช้สารคัดเลือกชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในพลาสมิดโดยตรงก็ได้ เช่น Zhang และคณะ (2005) ใช้ฟอสฟินนอททริซิน ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชเข้มข้นตั้งแต่ 0-5 มก./ล. หรือแมนโนส ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์เข้มข้นตั้งแต่ 0-10 มก./ล. ในการปลูกถ่ายยีนในใบคาร์เนชั่นสองพันธุ์ คือ Germen Red และ Gajepy

ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีผลต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน ความหนาแน่นสามารถวัดได้ 2 วิธีคือวัดในรูปความหนาแน่นของเชื้อจากค่า Optical density (OD) หรือการนับจำนวนเซลล์ (Number of cell) เช่น Zhang และคณะ (2005) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pEHA101 และ C58Cl ที่มีพลาสมิด pGV2260 มีค่า OD_{420} = 0.9-1.0 ทำการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนใบในคาเนชั่นสองพันธุ์ คือ Germen Red และ Gajepy สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Wang และ Ge (2005) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA

105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305 มีค่า OD_{600} = 0.5 ทำการปลูกถ่ายยีนกับเอ็มบริโอจินิคแคลลัสในหญ้าอาหารสัตว์ (*F. arundinacea*) สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 60 เปอร์เซ็นต์ และ Supartana และคณะ (2005) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pIG121-Hm มีค่า OD_{600} = 0.5 ปลูกถ่ายยีนกับเมล็ดข้าว สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 90 เปอร์เซ็นต์ Sugimura และคณะ (2005) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pIG 121-Hm และสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 PaCP มีค่า OD_{600} = 0.5 ปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนใบใน patchouli สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 86 เปอร์เซ็นต์ Nagamiya และ Takabe (2003) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ C58 ที่มีพลาสมิด pBI121 มีค่า OD_{600} = 0.5 ปลูกถ่ายยีนกับแคลลัสใน *Atriplex* สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 63.16 เปอร์เซ็นต์ Koroch และคณะ (2002) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pBISN1 มีค่า OD_{600} = 0.6-0.8 ทำการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนใบเลี้ยงใน *Echinacea purpurea* สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 1.9 เปอร์เซ็นต์ Men และคณะ (2003) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ AGL1 และ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 มีค่า OD_{600} = 0.8-1 ปลูกถ่ายยีนกับโปรโตคอร์มในกล้วยไม้ Dendrobium สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 58.7 เปอร์เซ็นต์ และ 6.2 เปอร์เซ็นต์ Hoque และคณะ (2005) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTOK233 มีค่า OD_{600} = 1 ทำการปลูกถ่ายยีนกับแคลลัสจากเอ็มบริโอในข้าว สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 48 เปอร์เซ็นต์ สุภาวดี (2548) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 มีค่า OD_{600} = 1 ทำการปลูกถ่ายยีนกับโปรโตคอร์มในกล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเปิดสามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 94.79 เปอร์เซ็นต์ รัชนก และคณะ (2548) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 มีค่า OD_{600} = 1 ปลูกถ่ายยีนกับโปรโตคอร์มในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ “เอียสกุล” สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 5 เปอร์เซ็นต์ Cho และ Widholm (2002) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pBIN*m-gfp5*-ER มีค่า OD_{600} = 1 ปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงในถั่วเหลือง สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 19.8 เปอร์เซ็นต์ Hewezi และคณะ (2002) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด pBIBo542 ปลูกถ่ายยีนกับต้นอ่อนในทานตะวัน สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 59 เปอร์เซ็นต์ Banerjee และคณะ (2005) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ GV2260 ที่มีพลาสมิด *StBEL5* มีค่า OD_{600} = 1.0-1.2 ปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนก้านใบเลี้ยงในมันฝรั่ง สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 91.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ โสภา (2541) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBI มีความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงในส้มจุก สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 81 เปอร์เซ็นต์ วิทูล (2541) ใช้เชื้อ *A. tumefaciens*

สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 มีความหนาแน่น 1.98 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนใบเลี้ยงมังคุด สามารถปลูกถ่ายยีนได้สำเร็จ 69.25 เปอร์เซ็นต์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกินที่มีผลต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนต่าง ๆ และการเกิดแคลลัสหน้าวัว
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือกที่มีผลต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนข้อและการเกิดแคลลัสหน้าวัว
3. เพื่อศึกษาปัจจัยบางประการในการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนหน้าวัวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม