# การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium*

# Isolation and Culture of Neck Orange (*Citrus reticulata* Blanco) Protoplasts and Gene Transformation by *Agrobacterium*

Order Key 21303
BIB Key 161191

เลขหมู่ SB371.O.NA ส194
เลขทะเบียน 15412 ว.2
5 ม.ค. 2542

โสภา ทวีคณะโชติ

Sopa Taweekanachote

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* |
| ผู้เขียน | นางสาวโสภา ทวีคณะโชติ |
| สาขาวิชา | พืชศาสตร์ |

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

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

| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* |
| ผู้เขียน | นางสาวโสภา ทวีคณะโชติ |
| สาขาวิชา | พืชศาสตร์ |
| ปีการศึกษา | 2541 |

## บทคัดย่อ


ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ใช้ใบเลี้ยง และใบจริงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog medium) ซึ่งปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 1 เดือน มาอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้สัดส่วนของใบหนัก 1 กรัม ต่อเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ หลังจากนั้นแยกโปรโตพลาสต์ ศึกษาจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละหน่วยทดลองแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด สำหรับการปลูกถ่ายยีนทำโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* การปลูกถ่ายยีนให้กับลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยวิธีการหยดเชื้อ และการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบโดยการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนจากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมและแคลลัส ภายหลังการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน และการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อเคมีจากกิจกรรมของ GUS (β–glucuronidase)

จากการศึกษา พบว่า ใบเลี้ยง ใบจริงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.09\times10^{7}$, $3.07\times10^{7}$ และ $8.48\times10^{6}$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิตสูงสุด 80.90, 85.86 และ 89.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อแยกด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ การอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด $9.20\times10^{6}$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และ 81.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 พบว่า ให้จำนวนและ

สำหรับการฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS โดยใช้วุ้นไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม NAA (α-naphthalene acetic acid) เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีพัฒนาการได้ดีที่สุด โปรโตพลาสต์ที่ได้จากใบซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 13.33 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน รองลงมา คือ โปรโตพลาสต์จากใบจริงจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง มีการแบ่งเซลล์ 9.19 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ในกรณีของโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ 4.00 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร MT (Murashige and Tucker medium) เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 29.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ อาหารสูตร MS เติม NAA และ BA ความเข้มข้นเดียวกัน โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 20.83 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถชักนำการสร้างโคโลนีและแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มจุกจากทั้ง 3 แหล่งได้

การปลูกถ่ายยีนโดยการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) เป็นเวลา 5 นาที ให้ความมีชีวิตรอดมากที่สุด 64 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ใด ๆ ส่วนการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงด้วยวิธีการหยดเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ส่งเสริมการสร้างยอด 93 เปอร์เซ็นต์ ยอดใหม่ที่สร้างทั้งหมดมีสีซีด หลังนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่หยดด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 (pIG121) ให้การสร้างยอด 50 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนนี้มีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถเลี้ยงบนอาหารที่มีคานามัยซินได้ เป็นเวลา 1 เดือน จากการศึกษาผลของความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง พบว่า *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอดรวม 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ EHA101 (pIG121) ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม 75 เปอร์เซ็นต์ พบกิจกรรมของ GUS ในลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเจริญและการรอดชีวิตของยอดบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบ พบว่า สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการ

พบกิจกรรมของ GUS จากการเลี้ยงร่วมแผ่นใบกับ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Isolation and Culture of Neck Orange (*Citrus reticulata* Blanco) Protoplasts and Gene Transformation by *Agrobacterium* |
| Author | Miss Sopa Taweekanachote |
| Major Program | Plant Science |
| Academic Year | 1998 |


## Abstract

Protoplasts were isolated from cotyledons and seedling leaves of the neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) raised on hormone-free MS (Murashige and Skoog) medium and leaves derived from culturing epicotyl explants on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA (benzyladenine). One month old leaves from all sources were stripped and incubated in a 10 ml solution of various combinations of enzymes at 25±2 °C for different periods, following which the number of viable protoplasts were counted and compared in each treatment using a completely randomized design. In the gene transformation study, epicotyl and leaf protoplasts were co-cultured with *Agrobacterium* with or without sonicator, following which the survival percentage of protoplasts, the percentage of multiple shoots and callus formation on kanamycin-containing medium were determined. GUS (β–glucuronidase) activity was tested histochemically.

The results showed that cotyledons and leaves derived from seedling and epicotyl culture gave mesophyll protoplasts of $1.09 \times 10^7$, $3.07 \times 10^7$ and $8.48 \times 10^6$ protoplasts/g fresh weight and gave the highest viability of 80.09, 85.86 and 89.19%, respectively, when incubated in 0.1% Pectolyase Y-23, 1.5% Cellulase Onozuka RS and 1.0% Macerozyme R-10. Incubating the leaves with the above enzyme solution for 3 hours also gave the highest yields of viable protoplasts at $9.20 \times 10^6$ protoplasts/g fresh weight and 81.43%, respectively. Comparing the first and second pair of leaves, it was found that the number of viable protoplasts was not significantly different.

Culturing of the protoplasts by embedding in semisolid MS medium

best results in division of the protoplasts. Division of protoplasts from leaves derived from culturing epicotyl explants gave the highest frequency of 13.33% after 7 days of culture, followed by seedling leaves which gave division of protoplasts at 9.19% after 20 days of culture. Protoplasts isolated from cotyledons gave a budding frequency of 4.00% after 7 days of culture. The highest division of protoplasts, 29.92%, was obtained with MT (Murashige and Tucker) medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 2.0 mg/l BA followed by MS medium supplemented with NAA and BA at the same concentration. However, microcolony or callus formation could not be induced from all sources of the protoplasts.

The transformation study showed that co-cultivation of protoplasts with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) for 5 minutes gave the highest survival rate of 64% after 72 hours of culture. However, division of protoplasts was not seen. Epicotyls co-cultured with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) gave the highest percentage of shoot formation (93%). All shoots were pale (unhealthy) when they were transferred for culture onto kanamycin-containing medium. Epicotyls co-cultured with *Agrobacterium*, EHA101 (pIG121) gave 50% shoot formation. Ten percent of the shoots could be maintained for a month on kanamycin-containing medium. For density of *Agrobacterium* tested, it was found that co-culture of epicotyl explants with *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) at a density of $1x10^{12}$ cells/ml gave shoot formation of 81% while EHA101 (pIG121) at a density of $1x10^{10}$ cells/ml gave shoot formation of 75%. Positive activity of GUS was observed in the original epicotyl explants co-cultured with both strains of *Agrobacterium*. However, growth and survival of the shoots were not evident in 100 mg/l kanamycin-containing medium. A study on the effect of the density of *Agrobacterium* on leaf transformation showed that *Agrobacterium*, LBA4404 (pBI121) at a density of $1x10^{12}$ cells/ml together with sonicator gave callus formation of 25%. EHA101 (pIG121) at a density of $1x10^{10}$ cells/ml together with sonicator gave callus formation of 56%. GUS activity was found in the calli derived from the leaves co-cultured with both strains of *Agrobacterium;* however, the calli could not be regenerated on selective medium supplemented with 50 mg/l kanamycin.

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำทั้งในด้านการเรียน การวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี และรองศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ตามโครงการทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ ปีการศึกษา 2539-2540 และสภาสถาบันราชภัฏ สถาบันราชภัฏภูเก็ต ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาภายในประเทศ ตามโครงการพัฒนาการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในสถาบันราชภัฏ (พวส.) ปีการศึกษา 2541 และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ และคณาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณจบ สุวรรณโชติช่วง คุณลุงผู้อารี คุณธวัชชัย-ปราณี ทวีคณะโชติ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพอย่างสูง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ขอบคุณ คุณพิเชษฐ์ ทวีคณะโชติ พี่ชาย และคุณลดาวัลย์ ทวีคณะโชติ น้องสาว ที่คอยให้กำลังใจตลอดมา

ขอบคุณ คุณมณฑา จำเริญรักษ์ คุณอรวรรณ พรหมสังคหะ และเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่คอยให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดี

โสภา ทวีคณะโชติ

# สารบาญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | (3) |
| Abstract | (6) |
| กิตติกรรมประกาศ | (8) |
| สารบาญ | (9) |
| รายการตาราง | (10) |
| รายการภาพ | (11) |
| ตัวย่อและสัญลักษณ์ | (13) |
| บทที่ | |
| 1.บทนำ | 1 |
| บทนำต้นเรื่อง | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| วัตถุประสงค์ | 16 |
| 2. วิธีการวิจัย | 17 |
| วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ | 17 |
| วิธีการศึกษา | 22 |
| 3. ผล | 27 |
| 4. วิจารณ์ | 60 |
| 5. สรุป | 72 |
| เอกสารอ้างอิง | 74 |
| ภาคผนวก | 84 |
| ประวัติผู้เขียน | 89 |

# รายการตาราง


ตารางที่ หน้า

1. ผลของชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ 29
2. ผลของระยะเวลาการอินคิวเบทต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ 33
3. ผลของตำแหน่งใบต่อความสามารถในการแยกโปรโตพลาสต์ 34
4. ผลของความหนาแน่น และวิธีการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ 36
5. ผลของโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ 37
6. ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจิญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ 42
7. ผลของระยะเวลาการเลี้ยงร่วมและชนิดพลาสมิดใน *Agrobacterium* ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์หลังการวางเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่าง ๆ 44
8. จำนวนและเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มจุกที่เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายเชื้อต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจผลหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 45
9. ผลของชนิดและความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 50
10. ผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบส้มจุกร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลท์ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 56

# รายการภาพ


ภาพที่ หน้า

1. ลักษณะของโปรโตพลาสต์จากแหล่งชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่แยกโดยใช้สารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง 30
2. โปรโตพลาสต์จากใบจริงจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุก (x300) แยกในสารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง 31
3. โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงส้มจุก (x100) แยกในสารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง 32
4. การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง (ศรชี้) (x300) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจล ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน 38
5. การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบจริงส้มจุก (ศรชี้) (x300) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจล ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 20 วัน 39
6. การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงส้มจุก (x300) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจล ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน 40
7. ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* แล้วเลี้ยงร่วมบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 46

## รายการภาพ (ต่อ)


ภาพที่ หน้า

8. เปอร์เซ็นต์การตายและชีดของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) และ EHA101 (pIG121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 47

9. ยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุกด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) และ EHA101 (pIG121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 48

10. ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 51

11. กิจกรรมของ GUS (ศรชี้) ในลำต้นเดิมหลังการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นเวลา 1 เดือน บนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 52

12. เปอร์เซ็นต์การตายและชีดของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 53

13. เปอร์เซ็นต์การตายและชีดของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 (pIG121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 53

14. ยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุกด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน 54

15. กิจกรรมของ GUS (blue spot) หลังการเลี้ยงแผ่นใบร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับร่วมกับ sonicator เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (x30) 58

16. กิจกรรมของ GUS (blue spot) หลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 (pIG121) ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ก) (x30) และ 3 สัปดาห์ (ข) 59

# ตัวย่อและสัญลักษณ์

| | | |
|---|---|---|
| 2, 4-D | = | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid |
| BA | = | benzyladenine |
| BH3 | = | citrus leaf protoplast culture medium |
| CaMV35S | = | cauliflower mosaic virus 35S promotor |
| *cat* | = | chloramphenicol acetylphosphotransferase |
| CRD | = | Completely Randomized Design |
| DMRT | = | Duncan's Multiple Range Test |
| $GA_3$ | = | gibberellic acid |
| GUS | = | β-Glucuronidase |
| *hpt* | = | hygromycin phosphotransferase |
| IAA | = | indole-3-acetic acid |
| LB | = | Lauria Broth |
| MES | = | 2-(N-morpholinoethanesulfonic acid) |
| MS | = | Murashige and Skoog (medium) |
| MT | = | Murashige and Tucker (medium) |
| NAA | = | α-naphthaleneacetic acid |
| *npt*II | = | neomycin phosphotransferase II |
| PEG | = | polyethylene glycol |
| T-DNA | = | transferred DNA |
| X-Gluc | = | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid |
| YEB | = | Yeast Extract Broth |
| ZEA | = | zeatin |

# บทที่ 1

# บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) เป็นไม้ผลพื้นเมืองที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้ จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae มีขนาดทรงพุ่มเมื่อโตเต็มที่ 3-5 เมตร ผลของส้มจุกต่างจากส้มอื่น ๆ คือ ขั้วผลมีคอ (neck) สูง ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของส้มพันธุ์นี้ จึงเรียกชื่อตามลักษณะผลว่า "ส้มจุก" สำหรับพันธุ์มีเพียงพันธุ์เดียว แต่มี 2 ลักษณะ คือ ชนิดขั้วผลใหญ่ และขั้วผลเล็ก ชนิดที่ขั้วผลใหญ่ตามลำต้นมีหนาม ทรงพุ่มแคบ ผลใหญ่ เม็ดสารใหญ่ เปลือกหนา แต่ผลผลิตน้อย ชนิดขั้วผลเล็กตามลำต้นไม่มีหนาม หรือหากจะมีบ้างก็เป็นหนามสั้น ๆ ทรงพุ่มกว้าง ให้ผลผลิตมาก (ประสงค์ หนูแดง, 2540) ผลส้มจุกมีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5-7.0 เซนติเมตร น้ำหนักผล 145-190 กรัม เนื้อผลมีปริมาณน้ำตาล 8 เปอร์เซ็นต์ เปลือกหนา 0.3-0.4 เซนติเมตร ผิวผลขรุขระ เมื่อสุกแก่มีการเปลี่ยนสีผิวผลเพียงเล็กน้อย มีต่อมน้ำมันใหญ่และถี่ตลอดผล เปลือกหนา ล่อน ปอกง่าย มีกลีบประมาณ 9-11 กลีบ ผนังกลีบหนาและเหนียว แยกออกจากกันได้ง่าย เม็ดสารค่อนข้างบางยาว และฉ่ำน้ำ เนื้อมีสีเหลืองอ่อนและใส รสหวาน หอม อมเปรี้ยวเล็กน้อย เมล็ดน้อย ประมาณ 4-5 เมล็ดต่อผล (มงคล แซ่หลิม, 2536) พื้นที่ปลูกส้มจุกมีมากแถบจังหวัดสงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และยะลา การขยายพันธุ์ส้มจุกสามารถทำได้โดยวิธีการติดตา ต่อกิ่ง หรือการตอน ซึ่งปัจจุบันกิ่งพันธุ์ส้มจุกที่นำมาปลูกมักประสบปัญหากิ่งพันธุ์มีโรคติดมาด้วย ทำให้ต้นส้มเป็นโรค ผลผลิตลดลง และต้นส้มตายในที่สุด โรคที่สำคัญได้แก่ โรคทริสติซา และโรคกรีนนิ่ง ดังนั้นในปัจจุบันการขยายพันธุ์ส้มจุกเพื่อให้ได้พืชต้นใหม่ที่ปราศจากโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับเป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น รวมไปถึงการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โปรโตพลาสต์ (protoplast) ซึ่งโปรโตพลาสต์คือ เซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) พืชทุกชนิดนอกจากมีเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) แล้ว ยังมีผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เซลล์พืชแต่ละเซลล์เชื่อมติดกันด้วยชั้นมิดเดิลลาเมลลา ซึ่งประกอบด้วยสารเพคติน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ มี 2 วิธี คือ วิธีกล โดยการนำใบมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในสารละลายเกลือความเข้มข้นสูง ทำให้ผนัง

แยกโปรโตพลาสต์จากรากมะเขือเทศ ต่อมา Nagata และ Takabe (1971) ได้ค้นพบวิธีการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีการขั้นตอนเดียว คือ การผสมเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าด้วยกัน เอนไซม์ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่จะย่อยให้เซลล์แต่ละเซลล์ให้หลุดออกมาเป็นอิสระ ทำให้สะดวกต่อการย่อยผนังเซลล์ เอนไซม์พวกนี้ คือ มาเซอโรไซม์ (Macerozyme) เมื่อแต่ละเซลล์หลุดเป็นอิสระแล้วเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งจะทำการย่อยผนังเซลล์ เอนไซม์พวกนี้ คือ เซลลูเลส ดังนั้นในการย่อยเซลล์เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จึงต้องใช้เอนไซม์ 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ เพคติเนสหรือมาเซอโรไซม์ใช้สำหรับย่อยมิดเดิลลาเมลลา และกลุ่มที่สอง คือ เซลลูเลสใช้ย่อยผนังเซลล์ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) องค์ประกอบของเอนไซม์แต่ละชนิดในอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายออสโมติคัม อันได้แก่ น้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล และซอร์บิทอล สารละลายเหล่านี้ที่ความเข้มข้นพอเหมาะช่วยให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเป็นจำนวนมาก โปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ลำต้น ปลายยอด ฝัก ไข่อ่อน คัพภะ เซลล์ซัสเพนชัน (cell suspension) และแคลลัสที่ได้จากการนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โปรโตพลาสต์นอกจากจะนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการชักนำเป็นพืชต้นใหม่แล้ว ยังมีประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ระหว่างพืชต่างสกุลหรือสปีชีส์และใช้ประโยชน์ในด้านการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ และยังใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการปลูกถ่ายที่ผ่านการตัดต่อด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering)

การที่จะนำโปรโตพลาสต์ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ส้มจุกนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงเทคนิคขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เสียก่อน เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีคุณภาพ และปริมาณมากเพียงพอ ตลอดจนสามารถเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ในขณะเดียวกันก็มีการศึกษาระบบการปลูกถ่ายยีนที่เหมาะสมเพื่อเป็นแนวทางในการปลูกถ่ายยีนกับส้มจุกต่อไป ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก และระบบการปลูกถ่ายยีนที่เหมาะสม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ส้มจุก โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป นอกจากการปรับปรุงพันธุ์ส้มโดยการใช้โปรโตพลาสต์แล้วอาจมีการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนอื่น ๆ เช่น ใบ หรือลำต้นเหนือใบเลี้ยง เป็นต้น โดยใช้ *Agrobacterium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินมาเป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายยีน โดยเชื้อ *Agrobacterium* มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มี Ti plasmid (tumour inducing plasmid) ส่งเสริมการสร้าง

บาดแผล การนำเชื้อ *Agrobacterium* ไปใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยีนต้านทานไวรัส มาปลูกถ่ายเข้าสู่ส้มจุกที่อ่อนแอต่อโรค ก็จะได้ส้มจำลองพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัส อย่างไรก็ตาม ในส้มจุกยังไม่มีการศึกษาการปลูกถ่ายยีน ดังนั้นก่อนที่จะมีการปลูกถ่ายยีนต้านทานไวรัส จำเป็นต้องศึกษาระบบการปลูกถ่ายยีนในส้มจุกเสียก่อน ในการศึกษานี้จึงมีการทดลองปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะคานามัยซิน และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β–glucuronidase (GUS) เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบระบบการปลูกถ่ายยีน

## การตรวจเอกสาร

### 1. การแยกโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ คือ เซลล์พืชที่ถูกแยกผนังเซลล์ออกไปโดยวิธีกล (mechanical isolation) หรือโดยการใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) จึงเหลือเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์บาง ๆ ปัจจุบันการแยกโปรโตพลาสต์นิยมกระทำโดยการใช้เอนไซม์ เนื่องจากสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ปริมาณมากและคุณภาพสูง การแยกทำโดยนำเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และเนื้อเยื่อที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้อาจจะเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ โปรโตพลาสต์สามารถแยกได้จากเกือบทุกส่วนของพืช เช่น รากของต้นกล้า ใบเลี้ยง ใบ ยอดอ่อน กลีบดอก ละอองเกสร และผล หรืออาจแยกได้จากเซลล์ซัสเพนชัน และแคลลัส แต่เนื้อเยื่อใบและเซลล์ซัสเพนชัน เป็นที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากทั้งสองแหล่งให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงและโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดี โปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ภายใน 2-3 วัน หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์และเจริญเป็นแคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ในที่สุด การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชจะประสบผลสำเร็จมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญดังนี้ คือ

#### 1.1 แหล่งของโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่างกัน เช่น จากแคลลัส ใบ กลีบดอก ผล หรือรากของพืช มีความต้องการสภาวะต่าง ๆ สำหรับการแยกและการเพาะเลี้ยงต่างกันด้วย Evans และ Bravo (1983) กล่าวว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่ออะลูโลน ปลายราก หรือละอองเกสรต้องใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง และระยะเวลาในการอินคิวเบทนานกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ Te-chato (1989) ศึกษาเปรียบเทียบผลผลิต และการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากส่วนต่าง ๆ ของถั่วฝักยาวพันธุ์ มก.7 พบว่า โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ มีความมีชีวิตสูง และจำนวนมากแยกได้จากใบจริงคู่แรก ในระยะ 2 สัปดาห์หลังจากงอก โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง เซลลูเลส โอโนซูกะอาร์เอส 1 เปอร์เซ็นต์ และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 0.5 เปอร์เซ็นต์ อินคิวเบทเป็นเวลา 8 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ เซลล์ซัสเพนชัน และส่วนของลำต้น

Central Library
Prince of Songkla University



efficiency) สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบแก่ นอกจากนั้นยังพบว่าการลอกผิวใบด้านล่างออกแล้วนำไปอินคิวเบทในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส, ไซโลส, โซเดียม ไพรูเวท, กรดซิตริก, กรดมาลิก, กรดฟูมาริก ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) และ ZEA-riboside (zeatin-riboside) แล้วแช่ในสายละลายเอนไซม์เพื่อแยกโปรโตพลาสต์ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์ได้ดีขึ้น

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา (2537) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบที่ 3-4 นับจากยอดของมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 4-6 สัปดาห์ ก่อนแยกโปรโตพลาสต์นำใบมาลอกผิวใบด้านล่างออก แล้วตัดไปคว่ำในสารละลายน้ำตาลแมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จากนั้นอินคิวเบทร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงกว่าการไม่ลอกผิวใบด้านล่าง

โปรโตพลาสต์นอกจากแยกได้จากใบพืชแล้วยังสามารถแยกได้จากแหล่งอื่น เช่น Kobayashi และคณะ (1988) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของส้มพันธุ์ F.N. Washington navel orange ซึ่งชักนำจากนิวเซลลัสแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MT (Murashige and Tucker, 1969) เติม BA (benzyladenine) เข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนแยกโปรโตพลาสต์ได้ย้ายเซลล์ซัสเพนชันดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เป็นจำนวนมาก และจารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2534) แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันโกโก้ อายุ 6 วัน โดยใช้เอนไซม์ไดรซีเลส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้น้ำตาลซอร์บิทอล 0.5 โมลาร์ เป็นตัวปรับความเข้มข้นออสโมติค ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 อินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากสภาวะดังกล่าวสามารถแยกได้โปรโตพลาสต์ประมาณ $4.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ความมีชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในสารละลายเอนไซม์สำหรับแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันโกโก้ต้องเติมแคลเซี่ยมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เพราะสารดังกล่าวเป็นองค์ประกอบของเมมเบรนที่ช่วยสร้างความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่แตกง่าย

### 1.2 ชนิดของออสโมติคัม

เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์จึงอ่อนแอต่อสารละลายที่มีค่าออสโมติคสูงหรือต่ำ ดังนั้นระดับออสโมลาริตี้ของสารละลายเอนไซม์จึงมีความสำคัญต่อการ

ละลายภายนอกโปรโตพลาสต์ ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่าสารละลายภายใน ไหลเข้าสู่โปรโตพลาสต์ ทำให้โปรโตพลาสต์เต่ง และแตกในที่สุด ดังนั้นโปรโตพลาสต์จึงต้องอยู่ในสารละลายที่มีระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสม สารเคมีที่ใช้ปรับระดับความเข้มข้นออสโมติค เรียกว่า ออสโมติคัม (osmoticum) โดยทั่วไปมักใช้น้ำตาล เช่น กลูโคส หรือซูโครส และน้ำตาลแอลกอฮอล์อื่น ๆ เช่น แมนนิทอล ซอร์บิทอล เป็นต้น โดยอาจใช้แต่ละชนิดเดี่ยว ๆ หรือผสมกันก็ได้ Kao และ Michayluk (1971) อ้างโดย Evans และ Bravo (1983) กล่าวว่าในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบมักใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัม ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสหรือเซลล์ซัสเพนชันใช้กลูโคสหรือซอร์บิทอลแทน Shepard และ Totten (1975) อ้างโดย Evans และ Bravo (1983) กล่าวว่าความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีตั้งแต่ 0.23-0.9 โมลาร์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นออสโมติคของใบและสภาพแวดล้อม การทรีตใบในสภาพมืดก่อนการแยกโปรโตพลาสต์ และอายุของใบพืช อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นออสโมติคในการแยกโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับชนิด และชิ้นส่วนพืช ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบนั้นความเข้มข้นออสโมติคที่ใช้มักจะสูงกว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชัน เช่น การแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มใช้แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เป็นตัวปรับระดับออสโมลาริตี้ (Grosser and Chandler, 1987; Kobayashi *et al.*, 1988; Grosser and Gmitter, 1990) ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของส้มใช้สารละลายซอร์บิทอลปรับออสโมติคัมอยู่ในช่วง 0.3-0.45 โมลาร์ (Hidaka and Kajiura, 1988; Ling *et al.*, 1990) บางกรณีพบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของส้มต้องใช้ความเข้มข้นของออสโมติคัมสูงถึง 0.7 โมลาร์ (Ling *et al.*, 1989; Grosser *et al.*, 1989; Kunitake *et al.*, 1991; Niedz, 1993) หรือใช้สารละลายออสโมติคัม 2 ชนิดร่วมกัน คือ ใช้กลูโคส เข้มข้น 0.18 โมลาร์ ร่วมกับแมนนิทอล เข้มข้น 0.33 โมลาร์ (Hidaka and Kajiura,1988)

### 1.3 ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์มี 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มเซลลูเลส เช่น เซลลูเลส, ไดรซีเลส และเซลลูไลซิน (Cellulysin) กลุ่มเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) เช่น เฮมิเซลลูเลส และโรไซม์ (Rhozyme) และกลุ่มเพคติเนส เช่น เพคติเนส, มาเซอโรไซม์ และเพคโตไลเอส (Evans and Bravo, 1983) ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นกับชนิด และ[illegible]

โปรโตพลาสต์จากใบ sour orange (*Citrus aurantium* L.), Chinese box orange (*Severinia buxifolia* Poir. Ten.), 'Flying Dragon' (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), 'Swingle' citrumelo ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *C. paradisi* กับ *P. trifoliata*, และ 'Carrizo' citrange ลูกผสมระหว่าง *C. sinensis* กับ *P. trifoliata* โดยใช้เอนไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอเรส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ละลายอยู่ในสารละลายแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ $CaCl_2$ เข้มข้น 12.0 มิลลิโมลาร์ MES [2-(N- Morpholinoethanesulfonic acid)] เข้มข้น 6.0 มิลลิโมลาร์ และ $NaH_2PO_4$ เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์ ทำการอินคิวเบทใบร่วมกับเอนไซม์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง จากการทดลองสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ $2\text{-}6x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักใบสด 1 กรัม

Perales และ Shielder (1993) ศึกษาวิธีการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบแอปเปิ้ลที่ได้จากหลอดทดลอง 7 สายพันธุ์ โดยทำการหั่นใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแช่ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์-10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยเฮมิเซลลูเลส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และไดรซีเลส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย MES เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และแมนนิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 อินคิวเบทร่วมกับใบหั่นฝอย ในสภาพมืดเป็นเวลา 17 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ในช่วง $6x10^6$ - $1.6x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักสดใบ 1 กรัม

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา (2537) แยกโปรโตพลาสต์จากใบที่ 3-4 นับจากยอดของมะเขือเทศพันธุ์สีดา โดยใช้สารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยมาเซอโรไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากที่สุด และให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงที่สุด

Mills และ Hammerschlag (1994) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากใบท้อ (*Prunus persica*) โดยทำการอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลสอาร์-10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.71 โมลาร์ สามารถแยกได้จำนวนสูงสุด $1x10^6$-$1x10^8$ โปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักสดใบ 1 กรัม โดยโปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 94 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษา พบว่า การเติม

Reichert และ Liu (1996) ศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ของปอกระเจา (*Hibiscus cannabinus* L.) จากใบที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ทำการอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์เซลลูไลซิน เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ จากใบปอกระเจาได้ปริมาณสูงสุด $0.9x10^5$-$5.9x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด 1 กรัม และโปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 53-87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบที่ปลูกนอกหลอดทดลอง

2. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ การเลี้ยงในอาหารจึงต้องเติมออสโมติคัมลงไปด้วยในทำนองเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์และโดยทั่วไปความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ใช้เพาะเลี้ยงเท่ากับออสโมติคัมที่ใช้แยก นอกจากนี้ชนิดของออสโมติคัมเป็นชนิดเดียวกันด้วย Kobayashi และคณะ (1983) ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสซึ่งชักนำจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัสของส้มพันธุ์ Trovita (*Citrus sinensis* Osbeck) พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ปรับความเข้มข้นออสโมติคด้วยซูโครส 0.15 โมลาร์ และกลูโคส 0.45 โมลาร์ เติมวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ สภาพการให้แสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์สร้างโคโลนี และพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์สีเขียวได้ภายใน 1-2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ เมื่อย้ายเอ็มบริออยด์มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน เติม $GA_3$ (gibberellic acid $A_3$) เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ให้งอกเป็นพืชต้นใหม่ได้หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

Kobayashi และคณะ (1985) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากนิวเซลลัสแคลลัสของส้มพันธุ์ Trovita พบว่า ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ $2x10^4$ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ปรับความเข้มข้นออสโมติคด้วยแมนนิทอลเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ถึงความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ $6x10^4$ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ปรับออสโมติคัมด้วยแมนนิทอล เข้มข้น 0.35 โมลาร์ โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่นต่ำ $4x10^4$ ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับแมนนิทอลความเข้มข้นต่ำ 0.25 โมลาร์ เท่านั้นที่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ 75 เปอร์เซ็นต์

(1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้ม 3 พันธุ์ คือ Washington

โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ได้ดีในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมซูโครส 0.09 โมลาร์ กลูโคส 0.08 โมลาร์ แมนนิทอล 0.23 โมลาร์ MES 5 มิลลิโมลาร์ IAA (Indole-3-acetic acid) 1 ไมโครโมลาร์ ZEA 1 ไมโครโมลาร์ และ $GA_3$ 10 ไมโครโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.6 วางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงที่ความเข้มแสง 4.7-8.6 วัตต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 ±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายเอ็มบริออยด์ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน เติม $GA_3$ 1 ไมโครโมลาร์ และซูโครส 0.06 โมลาร์ วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 8.4-14.5 วัตต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้เอ็มบริออยด์งอกเป็นพืชต้นใหม่ได้หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 เดือน

Ling และคณะ (1990) ศึกษาวิธีการวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซึ่งชักนำจากเมล็ดอ่อนของส้ม satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) และเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ปรับความเข้มข้นออสโมติคด้วยซูโครส 0.3 โมลาร์ และซอร์บิทอล 0.3 โมลาร์ วางเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส พบว่าโปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 10-14 วัน และพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนี 10 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน กลุ่มโคโลนีพัฒนาเป็นโซมาติคเอ็มบริโอหลังวางเลี้ยง 60 วัน เมื่อย้ายโซมาติคเอ็มบริโอไปชักนำยอดและรากบนอาหารสูตร MT เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 35.3 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส สามารถชักนำยอด และรากได้ต้นพืชที่สมบูรณ์

Niedz (1993) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชันของ sweet orange พันธุ์ Hamlin (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Hamlin) ด้วยวิธีการห่อหุ้มโปรโตพลาสต์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตบีด (Ca-alginate bead) ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ด้วยวิธีการหยดเซลล์ซัสเพนชันโปรโตพลาสต์ปริมาณ 15 หยด ลงในจานเพาะเลี้ยงที่บรรจุสารละลายเกลือ CPW (citrus protoplast washing) และแคลเซียม 70 มิลลิโมลาร์ (CPW/70Ca) อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างสารละลาย CPW/70Ca ออกเติมอาหาร CPM1 (citrus protoplast medium 1) ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและอาหารรองของสูตร MS แต่ไม่เติม $NH_4NO_3$ และปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่ดัดแปลงโดยการเติมวิตามิน กรดอะมิโนต่าง ๆ ร่วมด้วย สารสกัดจากมอลท์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร,

ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 4 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า มีการแบ่งเซลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การวางเลี้ยงในอาหารเหลวมีการแบ่งเซลล์เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ หลังจากวางเลี้ยงในแคลเซียมอัลจิเนตบีด เป็นเวลา 21 วัน ย้ายเอ็มบริออยด์ไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติมอะดีนีนซัลเฟต 185 ไมโครโมลาร์ สารสกัดจากมอลท์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 5.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 และย้ายเอ็มบริออยด์ไปชักนำยอดในสูตร MT เติม $GA_3$ 3 ไมโครโมลาร์ ซูโครส 5.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 และชักนำรากในสูตร MT เติม NAA 0.05 ไมโครโมลาร์ ซูโครส 3.0 เปอร์เซ็นต์

Ohgawara และคณะ (1985) ทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*) กับส้มพันธุ์ Trovita แบบหยดด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ปรับความเข้มข้นออสโมติคด้วยซูโครส 0.6 โมลาร์ วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 1,700 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน พบว่า โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นโคโลนี เมื่อวางเลี้ยงต่อมาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เติมอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ซูโครส 0.3 โมลาร์ วุ้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ได้ ย้ายเอ็มบริออยด์ไปชักนำใบเลี้ยงในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมสารสกัดจากมอลท์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดีนีนซัลเฟต 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นย้ายไปชักนำยอดและรากในอาหารสูตร MT เติม $GA_3$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5-6 เดือน ได้เป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ มีใบประกอบ 3 ใบย่อยเหมือนส้มสามใบ แต่ใบมีลักษณะเรียบ ขนาดและความหนาของใบเหมือนส้มพันธุ์ Trovita โดยพืชลูกผสมที่ชักนำได้มีโครโมโซม 4 ชุด 2n=4x=36

Kobayashi และคณะ (1991) ทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่าง F.N. Washington navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck var. *brasiliensis* Tanaka) กับ Murrcott tanger ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมซูโครส เข้มข้น 0.6 โมลาร์ และผงวุ้นอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติมสารสกัดจากมอลท์ เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร อะดีนีนซัลเฟต เข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริออยด์พัฒนาเป็นต้นอ่อนหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ย้ายต้นอ่อนไปชักนำพืชต้นใหม่โดยวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MT เติม $GA_3$ เข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส เข้มข้น

Motomura และคณะ (1997) เลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่าง Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Christm Swing.), Hazzara (*C. reticulata* Blanco), Ohta (*C. reticulata* Blanco), Saruwartari unshu (*C. unshu* Marc.), Kara mandarin (*C. unshu* x *C. nobilis* Lour.), Valencia orange (*C. sinensis* L. Osbeck) และ Siminnole tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macf.) กับโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบส้มและพืชสกุลใกล้เคียง คือ *Murraya paniculata* L. Jack, *Murraya koenigii* L. Spreng., *Glycosmis pentaphylla* Retz. Correa, *Merrillia caloxylon* Ridi. Swing., *Triphasia trifolia* Burm. f. P. wils., *Feroniella lucida* Scheff. Swing., *Aegle marmelos* L., *Swinglea glutinosa* Blanco Merr., rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.), yuzu (*Citrus janos* Sieb. ex Tan.), Miho Wase (*Citrus unshu* Marc.), *Severinia buxifolia* Poir. Tenore, *Atalantia monophylla* DC. และ *Microcitrus australis* Planch. Swing. ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.15 โมลาร์ และกลูโคส เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ตามวิธีการของ Motomura และคณะ (1995) และทำการคัดเลือกลูกผสมโดยย้ายไปวางเลี้ยงแบบตรึงในอาหารวุ้นสูตร MS เติมกาแลคโตส เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ $GA_3$ เข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ พบว่า โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 6, 8 และ 12 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ดังกล่าวพัฒนาเป็นโคโลนีขนาดเล็ก และเอ็มบริออยด์สีเขียวตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ขึ้นอยู่กับความใกล้และไกลทางพันธุกรรมของคู่ผสม

### 3. การปลูกถ่ายยีนในส้ม

การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการปลูกถ่ายยีนในส้มสามารถทำได้โดยตรง และโดยผ่านตัวกลางคือ *Agrobacterium* ซึ่งมี Ti /Ri plasmid กลุ่มยีนเหล่านี้ประกอบด้วยยีนสำคัญ คือ *Vir* A มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการจดจำสารประกอบฟีนอล คือ อะซิโตไซริงกอน ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเมื่อเกิดบาดแผล ยีน *Vir* D2 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่งแขนด้านขวา (Right border; RB) และแขนด้านซ้าย (Left border; LB) ทำให้เกิดเป็น T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) เคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์พืชโดยเริ่มจากปลายด้าน RB เข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมพืช จึงมีการแสดงออกของยีนที่อยู่บนส่วนของ T-DNA (Steck *et al.*, 1990)

การปลูกถ่ายยีนในส้มมีรายงานเป็นครั้งแรกโดย Kobayashi และ Uchimiya (1989)

(*npt*II) ต้านทานต่อคานามัยซิน ซึ่งมีโปรโมเตอร์ควบคุมการสร้างโนพาไลน์ (nopaline) ทำการปลูกถ่ายยีนตามวิธีการของ Krens และคณะ (1982) ภายหลังการปลูกถ่ายยีนให้กับโปรโตพลาสต์แล้วเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นเติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินซัลเฟต เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ผ่านการปลูกถ่ายยีน ผลการทดลอง พบว่า การใช้โปรโตพลาสต์ความหนาแน่นเริ่มต้น $9x10^5$ ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ DNA และ PEG (polyethylene glycol) ตามวิธีการข้างต้น สามารถชักนำโคโลนีขนาดใหญ่กว่า 1 มิลลิเมตร ได้จำนวน 10 โคโลนี โดย 8 โคโลนี รอดชีวิต และพัฒนาในอาหารคัดเลือก จากการตรวจสอบด้วยวิธีการ Southern blot พบว่า มีเพียง 2 โคโลนี ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ *npt*II อย่างไรก็ตามไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสได้ ต่อมา Vardi และคณะ (1990) ปลูกถ่ายพลาสมิด pCAP212 ซึ่งมียีน *npt*II และยีน chloramphenicol acetylphosphotransferase (*cat*) ต้านทานต่อคลอแรมฟีนิคอล เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของส้ม rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) ด้วยวิธีการใช้ PEG หลังจากการปลูกถ่ายยีน เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *cat* และทำการคัดเลือกโคโลนีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งคัดเลือกเติมพาโรโมมัยซินซัลเฟต พบว่า มีจำนวน 21 โคโลนีที่ผ่านการคัดเลือก และสันนิษฐานว่ามียีน *npt*II เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อมา พบการแสดงออกของยีน *npt*II ในต้นอ่อน จำนวน 9 ต้น จากการทดลองนี้สามารถชักนำพืชต้นใหม่ที่มีการปลูกถ่ายยีนได้ จำนวน 2 ต้น

การปรับปรุงพันธุ์ส้มนอกจากทำได้โดยวิธีการปลูกถ่ายยีนโดยตรง แล้วยังสามารถปลูกถ่ายยีนโดยผ่านตัวกลาง คือ *Agrobacterium* โดย Hidaka และคณะ (1990) ปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ซัสเพนชันของส้มพันธุ์ Trovita และพันธุ์ Washigton navel orange โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ที่มีโครงสร้างพลาสมิดประกอบด้วยยีน *npt*II และ hygromycin phosphotransferase (*hpt*) ต้านทานไฮโกรมัยซิน และมี cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S เป็นโปรโมเตอร์ โดยใช้ความหนาแน่นเชื้อ ประมาณ 100-200 เซลล์ต่อกลุ่มเซลล์โคโลนี จากการทดลอง พบว่า เซลล์โคโลนี และเอ็มบริโอที่ชักนำได้มีลักษณะต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน

Moore และคณะ (1989) อ้างโดย Gmitter และคณะ (1992) เป็นผู้เริ่มการทดลองปลูกถ่ายยีนในส้มโดยใช้ *Agrobacterium* กับชิ้นส่วนลำต้นจากต้นกล้า Carrizo citrange ที่เพาะในหลอดทดลอง ชิ้นส่วนลำต้นที่ใช้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดเชื้อ *Agrobacterium*

บนอาหารสูตรเดียวกัน เติมสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองใช้คาร์เบนนิซิลลิน พบว่า มีผลยับยั้งการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนลำต้น จึงทดลองใช้ซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดี และไม่มีผลต่อการสร้างยอดรวม หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติมสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน คือ คานามัยซิน ซึ่งในการทดลองส่วนใหญ่ใช้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลอง พบว่า มีการสร้างยอดใหม่ในอาหารคัดเลือก 25 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกิจกรรมของ GUS เมื่อชักนำรากแล้วย้ายปลูกลงดินสามารถมีชีวิตรอด และจากการตรวจสอบ พบว่า มีการแสดงออกของยีนที่ปลูกถ่าย และต่อมา Moore และคณะ (1992) ทดลองปลูกถ่ายยีนในส้มสามชนิด คือ Carrizo citrange, Swingle citrumelo (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata*) และ Key lime โดยใช้ *Agrobacterium* สายเชื้อเดียวกัน วิธีการปลูกถ่ายยีนโดยการวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นส้มที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2-4 เดือน ความยาว 1 เซนติเมตร ในแนวตั้งโดยวางด้านโคนหรือปลายส้มผัสอาหารในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดเชื้อ *Agrobacterium* บนชิ้นส่วนลำต้นที่วางโผล่พ้นอาหาร วางเลี้ยง 2-3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันเติมซีโฟทาซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินออกจนหมดจึงย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารสูตร MT เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยง 4-8 สัปดาห์ ตัดฐานยอดและลำต้นเดิมไปทดสอบการปลูกถ่ายยีนส่วนปลายยอดนำไปชักนำรากในอาหารสูตร MT เติม NAA (α-naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลอง พบว่าประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนมีประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ในกรณีลำต้นเดิมของส้ม Carrizo citrange ที่หยดเชื้อ *Agrobacterium* ส้มให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ GUS มากที่สุด 8.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ส้ม Swingle citrumelo และ Key lime ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ GUS 4.9 และ 3.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยอดใหม่ที่พัฒนาจากชิ้นส่วนลำต้นที่หยดเชื้อ *Agrobacterium* พบว่า ในกรณีการวางเลี้ยงให้ด้านปลายส้มผัสอาหารในส้ม Carrizo citrange ให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ GUS มากที่สุด 2.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Swingle citrumelo และ Key lime ที่วางเลี้ยงให้ด้านโคนส้มผัสอาหารซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ GUS 0.4 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยอดใหม่ส้ม Carrizo citrange ที่มีการแสดงออกของ GUS สามารถสร้างรากได้ดีในอาหารเติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อย้ายปลูกลงดินมีชีวิตรอด และเมื่อตรวจสอบพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่

Pena และคณะ (1995a) ทดลองปลูกถ่ายยีนในส้ม Carrizo citrange ด้วย *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 มีพลาสมิด p35SGUSINT มียีน *npt*II ต้านทานต่อคานามัยซินใช้เป็นตัวคัดเลือก ยีน GUS เป็นยีนรายงานผล วิธีการปลูกถ่ายยีน ใช้ชิ้นส่วนลำต้นจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 5 สัปดาห์ ให้มีความยาว 1 เซนติเมตร จุ่มแช่ในเชื้อ *Agrobacterium* ความหนาแน่น $4x10^7$ และ $4x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวางเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นในแนวตั้งบนอาหารสูตรเดียวกัน แล้วหยดเชื้อ *Agrobacterium* บนชิ้นส่วนลำต้นที่โผล่พ้นอาหาร วางเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร คานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟทาซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และแวนโคมัยซิน เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1-4 เดือน ตัดยอดใหม่ที่สร้างจากชิ้นส่วนลำต้นไปทดสอบกิจกรรมของ GUS และส่วนปลายยอดที่เหลือนำไปเสียบยอดบนต้นกล้าส้ม Troyer citrange ในหลอดทดลอง วางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำยอดไปเสียบอีกครั้งบนส้ม rough lemon ในโรงเรือน จากการทดลอง พบว่า การใช้เชื้อ *Agrobacterium* ความหนาแน่น $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงร่วมกับเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนลำต้นในเชื้อแล้ววางเลี้ยงในแนวนอนบนอาหาร มีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนสูงสุด 20.6 เปอร์เซ็นต์ ยอดใหม่ที่สร้างขึ้นมีการแสดงออกของ GUS 55.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำยอดใหม่ที่นำไปเสียบยอดบนต้นตอมาตรวจสอบ พบว่า มีการแสดงออกของยีนที่ปลูกถ่าย และในปีเดียวกัน Pena และคณะ (1995b) ได้ทดลองปลูกถ่ายยีนในส้ม sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck) ด้วย *A. tumefaciens* สายเชื้อเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในโรงเรือน ฟอกฆ่าเชื้อ ตัดให้มีความยาว 0.5-1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากหยดเชื้อ *Agrobacterium* ความหนาแน่น $4x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนชิ้นส่วนลำต้นที่วางโผล่พ้นอาหาร แล้ววางเลี้ยง 2 วัน ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน แต่เพิ่มความเข้มข้นซีโฟทาซิม เป็น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำตามวิธีการเดียวกันดังกล่าวข้างต้น จากการทดลอง พบว่า ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนมีประมาณ 10.3 เปอร์เซ็นต์ และได้ส้มจำลองพันธุ์ 10 ต้น ที่สามารถมีชีวิตรอดเมื่อย้ายปลูกลงดิน Pena และคณะ (1997) ศึกษาการปลูกถ่ายยีนในส้ม lime (*C. aurantifolia* Swing.) ด้วย *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA105 มีพลาสมิด P35SGUSINT มียีนต้านทานคานามัยซิน (*npt*II) เป็นตัวคัดเลือก และมียีน GUS เป็นยีนรายงาน

แนวตั้งบนอาหารสูตร MSB1 ซึ่งประกอบด้วยเกลือแร่ของอาหารสูตร MS และวิตามินของอาหารสูตร White (White, 1951) เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นแนวนอนบนอาหาร tomato feeder plate เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติมสารปฏิชีวนะสำหรับคัดเลือก คือ คานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเจเนติซิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมซีโฟทาซิม 500 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือแวนโคมัยซิน เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน พบว่า การเลี้ยงร่วมด้วยวิธีการใช้ tomato feeder plate และเติมเจเนติซิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารคัดเลือก ให้ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนสูงสุด 83.3 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมของ GUS 38 จุดต่อชิ้นส่วน สำหรับการตรวจสอบจากการต้านทานคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน 82.0 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การวางเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นภายหลังการเลี้ยงร่วมในแนวตั้งบนอาหาร ให้ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนเพียง 42.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคัดเลือกโดยใช้คานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารคัดเลือก

นอกจากมีการปลูกถ่ายเข้าสู่ชิ้นส่วนลำต้นแล้ว ยังมีการศึกษาการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนอื่น เช่น ใบ Stephen และคณะ (1994) ทำการปลูกถ่ายยีนในใบโกโก้ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายเชื้อ A281 มีพลาสมิด pGVTV ที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ระดับความหนาแน่นเชื้อ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมกับใบอ่อนที่ตัดให้มีขนาด 3x10 มิลลิเมตร ในอาหารที่เติมอะซิโตไซริงกอน เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัดเชื้อส่วนเกินโดยการเติมคาร์เบนนิซิลิน เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และวางเลี้ยงคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ใบโกโก้ได้ 7 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่ได้ไม่สามารถชักนำเป็นพืชต้นใหม่ได้ Sriskandarajah และ Goodwin (1998) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนในใบแอปเปิ้ลจากการปรับสภาพที่เหมาะสมโดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด GA470X-2 ซึ่งมียีน *npt*II และพลาสมิด pGV3850 X KIWI (KIWI) ที่มียีน *npt*II กับยีนรายงานผล GUS ปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า $OD_{650}$ 0.042 เติมอะซิโตไซริงกอน เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และกลูโคส เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนใบที่ตัดแบ่งครึ่ง เป็นเวลา 20 นาที วางเลี้ยงในสภาพมืด เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปคัดเลือก โดยวางเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจสอบผลความสามารถในการปลูกถ่ายยีนจากกิจกรรมของ GUS ด้วยวิธีการเนื้อเยื่อเคมี (histochemical test) พบว่า สามารถปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ใบแอปเปิ้ลได้

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ แหล่งโปรโตพลาสต์ และระยะเวลาในการอินคิวเบทใบส้มจุกในสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหาร ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ และวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก
3. เพื่อศึกษาระบบการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนต่าง ๆ รวมถึงโปรโตพลาสต์ของส้มจุกด้วยเชื้อ *Agrobacterium*

# บทที่ 2

# วิธีการวิจัย

## วัสดุอุปกรณ์

### 1. วัสดุพืช

#### 1.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ด

นำเมล็ดพันธุ์ส้มจุก จากผลที่แก่เต็มที่ มาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น (Agar-Agar) เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในหลอด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางเลี้ยงหลอดละ 1 เมล็ด ที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน นำชิ้นส่วนใบ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง มาใช้ในการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ต่อไป

#### 1.2 การเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ตัดต้นเหนือใบเลี้ยงของส้มจุก ยาว 1 เซ็นติเมตร วางเลี้ยงโดยให้ส่วนโคนสัมผัสอาหาร บนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นำใบจากยอดใหม่ที่สร้างมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ และการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ต่อไป

### 2. เชื้อ *Agrobacterium*

ใช้เชื้อ *Agrobacterium* 2 สายเชื้อ คือ

- *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404
- *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101

สายเชื้อแรกมีพลาสมิด pBI121 และ pARK5 มียีนเครื่องหมายต้านทานต่อคานามัยซินและยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล เลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารแข็งหรือเหลวสูตร YEB (Yeast Extract Broth) เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด

Broth) เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและโครงสร้างพลาสมิดแสดงในภาคผนวกที่ 2-7)

3. **อุปกรณ์การทดลอง**

**ก. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร MS MT YEB และ AB
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช NAA และ BA
- สารเคมีบัฟเฟอร์ MES
- เอนไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส มาเซอโรไซม์ อาร์-10 และเพคโตไลเอส วาย-23
- แมนนิทอล
- สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบยีน GUS คือ เอ็กซ์กลุ๊ก (X-Gluc), โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมเอทธิลีน ไดอะมีนเตตราอะซิติกแอซิด ติตรอน เอ็กซ์-100 โซเดียมลอริลซาโคซินซัลเฟต และเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล
- สารอื่น ๆ คือ น้ำตาลซูโครส สารสกัดจากมอลท์ วุ้นไฟต้าเจล และสารปฏิชีวนะคานามัยซิน ไฮโกรมัยซิน และซีโฟทาซิม

**ข. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง**

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่องแก้ว และพลาสติคต่าง ๆ คือ พาสเจอร์ปิเปต สไลด์หลุม จานเพาะเลี้ยงขนาดต่าง ๆ ฮีมาไซโตมิเตอร์ กรวยกรองพลาสติค กระบอกฉีดยา
- เครื่องมือย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ใบมีด ด้ามมีด ปากคีบ จานเพาะเลี้ยง
- เครื่องเซ็นตริฟิวก์แบบตั้งโต๊ะพร้อมหลอดปั่น ขนาด 15 มิลลิลิตร
- ชุดกรองมิลลิพอร์พร้อมกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน
- เครื่องดูดสูญญากาศ

**ค. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร**

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนสารละลายไฟฟ้า
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- หม้อนึ่งความดันไอ

ง. อุปกรณ์อื่น ๆ

- กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด (inverted microscope) พร้อมชุดบันทึกภาพ
- ชุดตรวจสอบฟลูออเรสเซนส์ ประกอบกับกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด และชุดบันทึกภาพ

วิธีการ

1. การเตรียมเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 ความเข้มข้นต่าง ๆ ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เติม MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 แล้วกรองทำความสะอาดผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บเอนไซม์ในหลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ไม่ใช้ทันที

2. การเตรียมสารละลายล้าง (washing solution)

ใช้สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เตรียมโดยการชั่งแมนนิทอล 12.75 กรัม เติมธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การอินคิวเบทชิ้นส่วนพืช

นำใบส้มจุกมาหั่นฝอยตามขวางใบด้วยใบมีดผ่าตัด รวบรวมใบที่ตัดแล้วชั่งให้ได้ 1 กรัม คีบใบที่หั่นฝอยใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติคนึ่งฆ่าเชื้อ ขนาด 15x60 มิลลิเมตร เทสารละลายเอนไซม์ลงในจานเพาะเลี้ยง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดเพลทด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปอินคิวเบทในสภาพแสงสลัว ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบไปมา (reciprocal shaker) ความเร็ว 40 รอบต่อนาที

**4. การแยกโปรโตพลาสต์**

หลังทำการอินคิวเบทใบในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลาต่าง ๆ นำสารละลายผสมของโปรโตพลาสต์ กับเศษเซลล์มากรองผ่านไนล่อนเมช ขนาดช่อง 77 ไมครอน ใส่หลอดปั่น ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายเอนไซม์ตอนบน (supernatant) ออก ทำการล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้างสำหรับล้างนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง จนสารละลายเอนไซม์ถูกกำจัดออกหมด จากนั้นนำเซลล์ซัสเพนชันโปรโตพลาสต์ไปลอยบนสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ ซึ่งจะลอยอยู่ตอนกลางระหว่างสารละลายแมนนิทอล และสารละลายซูโครส นำมาล้างอีกครั้งในสารละลายล้าง ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์บนสไลด์นับเซลล์ฮีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล จำนวน ขนาด และรูปร่างโปรโตพลาสต์

**5. การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์**

ตรวจสอบความมีชีวิตโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (FDA) เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ในอัตราส่วนที่เท่ากันผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหยดบนสไลด์หลุม ปิดด้วยกระจกปิด แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสทำปฏิกริยากับ FDA แล้ว เรืองแสงสีเขียวเหลืองภายใต้คลื่นอัลตราไวโอเล็ต นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้คือ

$$\% \text{ ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

**6. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์**

ปรับโปรโตพลาสต์ให้มีความหนาแน่นต่าง ๆ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารแข็งและอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน และไซโตไคนินร่วมกันในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้

การเลี้ยงในอาหารแข็งใช้วุ้นอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวใช้ไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

7. การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium*

*A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และพลาสมิด pARK5 เลี้ยงในอาหารแข็งและเหลวสูตร YEB เติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีการ streak plate ส่วน *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 เลี้ยงในอาหารแข็ง AB และอาหารเหลวสูตร LB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธีการเดียวกัน วางเลี้ยงในสภาพมืด ย้ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุกเดือน และก่อนนำ *Agrobacterium* มาใช้ทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นย้ายเชื้อจำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YEB หรือ LB โดยอาหารทุกสูตรนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ยกเว้นสารปฏิชีวนะฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านมิลลิพอร์ ขนาด 0.22 ไมครอน เติมในอาหารขณะที่ยังอุ่นอยู่ (อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส)

8. การตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

ตัดใบ และเนื้อเยื่อบริเวณฐานยอด ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน ใส่จานหลุม (titer plate) 2-3 ชิ้นต่อหลุม เติมส่วนผสมของสารละลายเอ็กซ์กลุ๊ก เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 26 ไมโครลิตร กับไลซีสบัปเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เบต้า-เมอแคปโต-เอทธานอล เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ไดโซเดียมเอทธิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติคแอซิด เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ติตรอน เอ็กซ์-100 0.1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมลอริลซาโคซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 250 ไมโครลิตร นำไปดูดสูญญากาศ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วใช้เมทธิลแอลกอฮอล์ ล้างคลอโรฟิลล์ออก 3-4 ครั้ง ตรวจสอบการเกิดสีน้ำเงินของเนื้อเยื่อจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูเคอโรนิเดสกับเอ็กซ์กลุ๊ก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

## วิธีการศึกษา

### 1. ชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

นำใบเลี้ยง ใบจริงจากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงในหลอดทดลอง มาหั่นฝอย หนัก 1 กรัม แช่ในสารละลายเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้ววางเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที ภายใต้สภาพแสงสลัว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการแยกโปรโตพลาสต์ตามวิธีการในข้อ 4 จากนั้นนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ในเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

### 2. ระยะเวลาการอินคิวเบท

นำใบส้มจุกจากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัมจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ผสมซึ่งประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7 นำไปอินคิวเบท เป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จากนั้นแยก และทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ และตรวจสอบความมีชีวิต เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

### 3. ตำแหน่งใบต่อการแยกโปรโตพลาสต์

ตัดใบส้มจุกคู่ที่ 1 และ 2 จากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง หนัก 1 กรัม มาจุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์ผสมซึ่งประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์เซลลูเลส โอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7 นำไปอินคิวเบท เป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง แยกและทำบริสุทธิ์โปรโตพลาสต์ นับจำนวนโปรโตพลาสต์และตรวจสอบความมีชีวิตในแต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

**4. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์**

นำโปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้ คือ

4.1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดผนึกจานพลาสติคที่เลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม

4.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์แบบหยดแขวน โดยหยดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยในอาหารเหลวลงบนฝาครอบจานพลาสติคฆ่าเชื้อ ขนาด 15x60 มิลลิเมตร จานละ 5 หยด นำไปคว่ำปิดจานด้านล่าง ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปเลี้ยง

4.3 การฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารแข็ง โดยการเติมโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเติมวุ้นอากาโรส เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงที่ 26-28 องศาเซลเซียส ผสมจนเข้ากันดี จึงเพลทลงในจานฆ่าเชื้อขนาด 15x60 มิลลิเมตร ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยง

4.4 การฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยนำโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง เติมแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ กับวุ้นไฟต้าเจล เข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้โปรโตพลาสต์ฝังตัวอยู่ในอาหารวุ้น ปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยง

นำโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในจานพลาสติคทั้ง 4 วิธี ไปเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด บันทึกผลการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในแต่ละวิธีการเลี้ยงเปรียบเทียบกันหลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

**5. ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงต่อพัฒนาการ**

นำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมาเพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติคฆ่าเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15x60 มิลลิเมตร ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง คือ $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ ต่อ

โปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด บันทึกผลการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

**6. ผลของแหล่งโปรโตพลาสต์ต่อพัฒนาการ**

นำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบเลี้ยง และใบจริง มาเพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติคฆ่าเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15x60 มิลลิเมตร ด้วยความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±1 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด บันทึกผลการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากแต่ละแหล่งเปรียบเทียบกัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

**7. ผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์**

นำโปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $1x10^5$ ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS และ MT ร่วมด้วยแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เติม NAA เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบการพัฒนาของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในอาหารแต่ละสูตร

**8. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium***

นำโปรโตพลาสต์ ซึ่งแยกได้จากใบส้มจุก เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pARK5 โดยใช้โปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร กับเชื้อ *Agrobacterium* ความหนาแน่น $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 1) เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อ *Agrobacterium* ออกจากโปรโตพลาสต์ วางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และความสามารถในการปลูกถ่ายยีน จากกิจกรรมของ GUS ในแต่ละเวลาการเลี้ยงร่วม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกันในแต่ละสายเชื้อและระยะเวลาการเลี้ยงร่วม

9. การปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงตัดให้มีความยาว 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหาร หยดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 บนรอยตัดของชิ้นส่วน วางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการหยดเชื้อแล้วบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซีมเพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน ย้ายเลี้ยงจนกำจัดเชื้อหมด จึงย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมปราศจากซีโฟทาซิม วางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ตรวจผลความสามารถการสร้างยอดรวมเปรียบเทียบกันในแต่ละสายเชื้อ

ตัดใบและลำต้นใหม่ที่ชักนำได้มาตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และนำยอดใหม่ไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

10. ผลของความหนาแน่นของเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง

ใช้ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ตัดให้มีความยาว 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงในแนวตั้งให้ด้านโคนสัมผัสอาหาร ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ ที่ปรับความหนาแน่น $1x10^8$, $1x10^{10}$ และ $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนรอยตัดของชิ้นส่วน สำหรับชุดเปรียบเทียบหยดอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่มีเชื้อ *Agrobacterium* วางเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมปราศจากซีโฟทาซิม เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบผลความสามารถในการสร้างยอดรวมเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นเชื้อ

ตัดใบ และลำต้นของยอดใหม่ที่ชักนำได้ ไปตรวจสอบกิจกรรมของยีนรายงานผล GUS และนำยอดใหม่ไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของยอดที่ผ่านการปลูกถ่ายยีน

11. ผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบ

ใช้ชิ้นส่วนใบ อายุ 1 เดือน จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองทำแผลโดยกรีดผ่าน

มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที สำหรับชุดเปรียบเทียบ จุ่มแช่ในอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่มีเชื้อ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator นาน 2 วินาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส คือ อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอล์ท เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเติมซีโฟทาซิมเพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบผลการปลูกถ่ายยีน จากกิจกรรมของ GUS และความสามารถในการสร้างแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นเชื้อ จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตรชักนำแคลลัส เติมคานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

# บทที่ 3

# ผล

## 1. ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

เมื่อนำใบเลี้ยง ใบจริงจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง มาแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 2.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกได้จำนวนโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงสูงสุด $1.80 \times 10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ การใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกได้จำนวน $1.09 \times 10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมื่อนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มาตรวจสอบความมีชีวิต พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกด้วยการใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีความมีชีวิตสูงสุด 80.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบจริงของต้นกล้าเพาะเมล็ดนั้น พบว่า การใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 2.0 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกได้จำนวนสูงสุด คือ $3.86 \times 10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่โปรโตพลาสต์จากใบจริงมีความมีชีวิตสูงสุด 85.86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแยกด้วยการใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำสารละลายดังกล่าวมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง พบว่า สามารถแยกได้จำนวน $8.48 \times 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ความมีชีวิต 89.19 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ผลจากตารางที่ 1 ภาพที่ 1 พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตน้อยกว่าอัตราความเข้มข้นต่ำ และพบว่า มาเซอโรไซม์ อาร์-10 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อการทำให้เซลล์แยกเป็นอิสระ ง่ายต่อ

เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตที่แยกได้จากใบจริง และใบเลี้ยงสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากทั้ง 3 ชิ้นส่วน พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีขนาดใหญ่ที่สุด มีคลอโรพลาสต์หนาแน่น (ภาพที่ 1 ก) ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบเพาะเลี้ยงเมล็ดและใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่เล็กกว่าโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง (ภาพที่ 1 ข และ ค) นอกจากนี้ความหนาแน่นของคลอโรพลาสต์น้อยกว่าด้วย สำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วย FDA แสดงในภาพที่ 2 และ 3

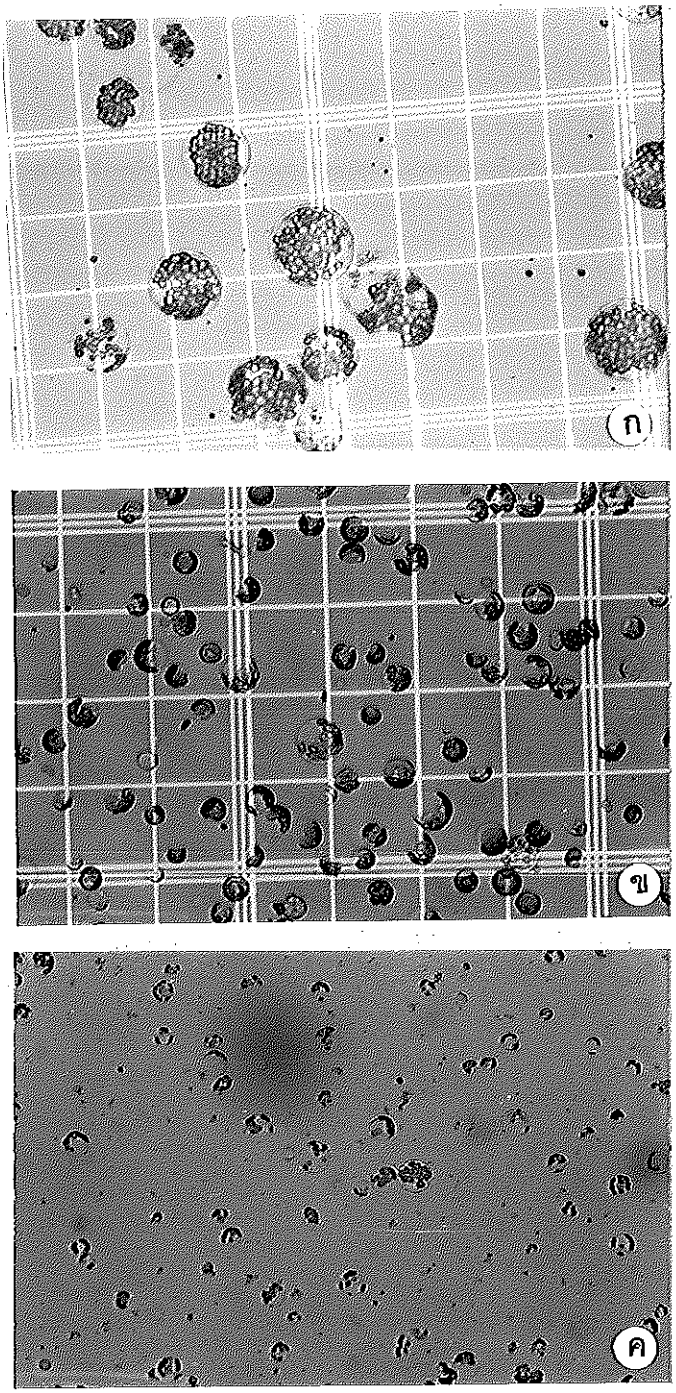
**ตารางที่ 1** ผลของชนิด และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่งโปรโตพลาสต์ | ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%) P Y-23 | CRS | M R-10 | โปรโตพลาสต์ / กรัมน้ำหนักสด | ความมีชีวิต (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| ใบเลี้ยง | 0.1 | 1.0 | 2.0 | $3.60x10^{6}$bc | 68.86 |
| | 0.1 | 1.5 | 1.0 | $1.09x10^{7}$a | 80.90 |
| | 0.1 | 2.0 | 1.0 | $2.80x10^{6}$c | 75.30 |
| | 0.1 | 2.0 | 2.0 | $7.20x10^{6}$b | 77.50 |
| | 0.1 | 1.5 | 2.0 | $1.80x10^{7}$a | 68.18 |
| **เฉลี่ย** | | | | $8.50x10^{6}$ | 74.15 |
| F-test | | | | ** | ns |
| C.V.(%) | | | | 21.96 | 19.14 |
| ใบจากต้นกล้าเพาะเมล็ด | 0.1 | 1.0 | 2.0 | $2.45x10^{7}$ | 68.45 |
| | 0.1 | 1.5 | 1.0 | $3.07x10^{7}$ | 85.86 |
| | 0.1 | 2.0 | 1.0 | $3.86x10^{7}$ | 68.53 |
| | 0.1 | 2.0 | 2.0 | $3.36x10^{7}$ | 64.29 |
| | 0.1 | 1.5 | 2.0 | $3.12x10^{7}$ | 64.60 |
| **เฉลี่ย** | | | | $3.17x10^{7}$ | 70.35 |
| F-test | | | | ns | ns |
| C.V.(%) | | | | 32.98 | 12.80 |
| ใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง | 0.1 | 1.5 | 1.0 | $8.48x10^{6}$ | 89.19 |

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์ในคอลัมน์ที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

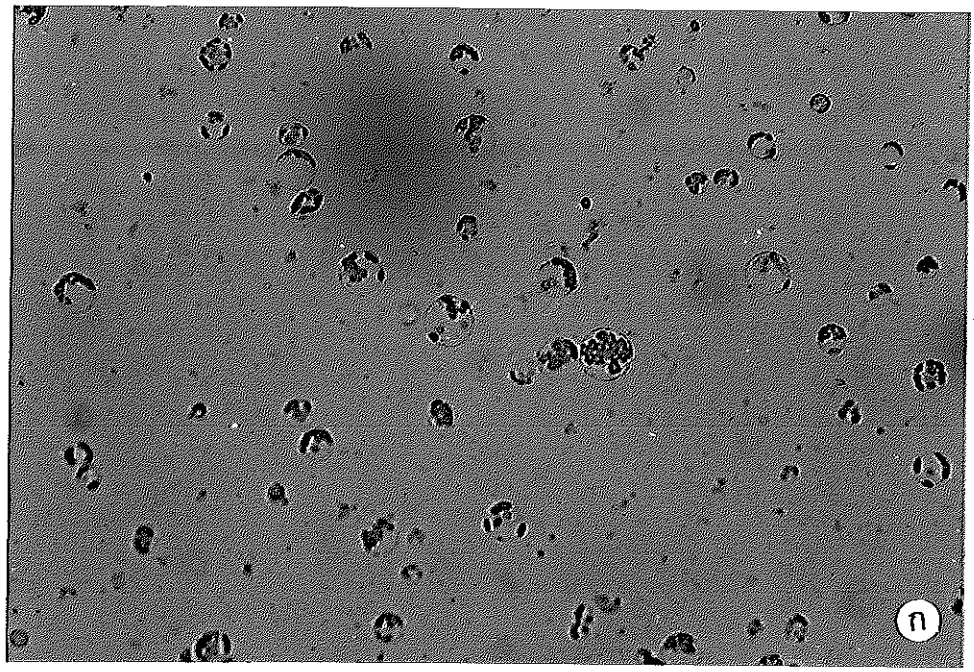
P Y-23 = เพคโตไลเอส วาย 23 CRS = เซลลูเลสโคโมซาเคาส์




**ภาพที่** 1 ลักษณะของโปรโตพลาสต์จากแหล่งชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่แยกโดยใช้สารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ก. โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง (x300)

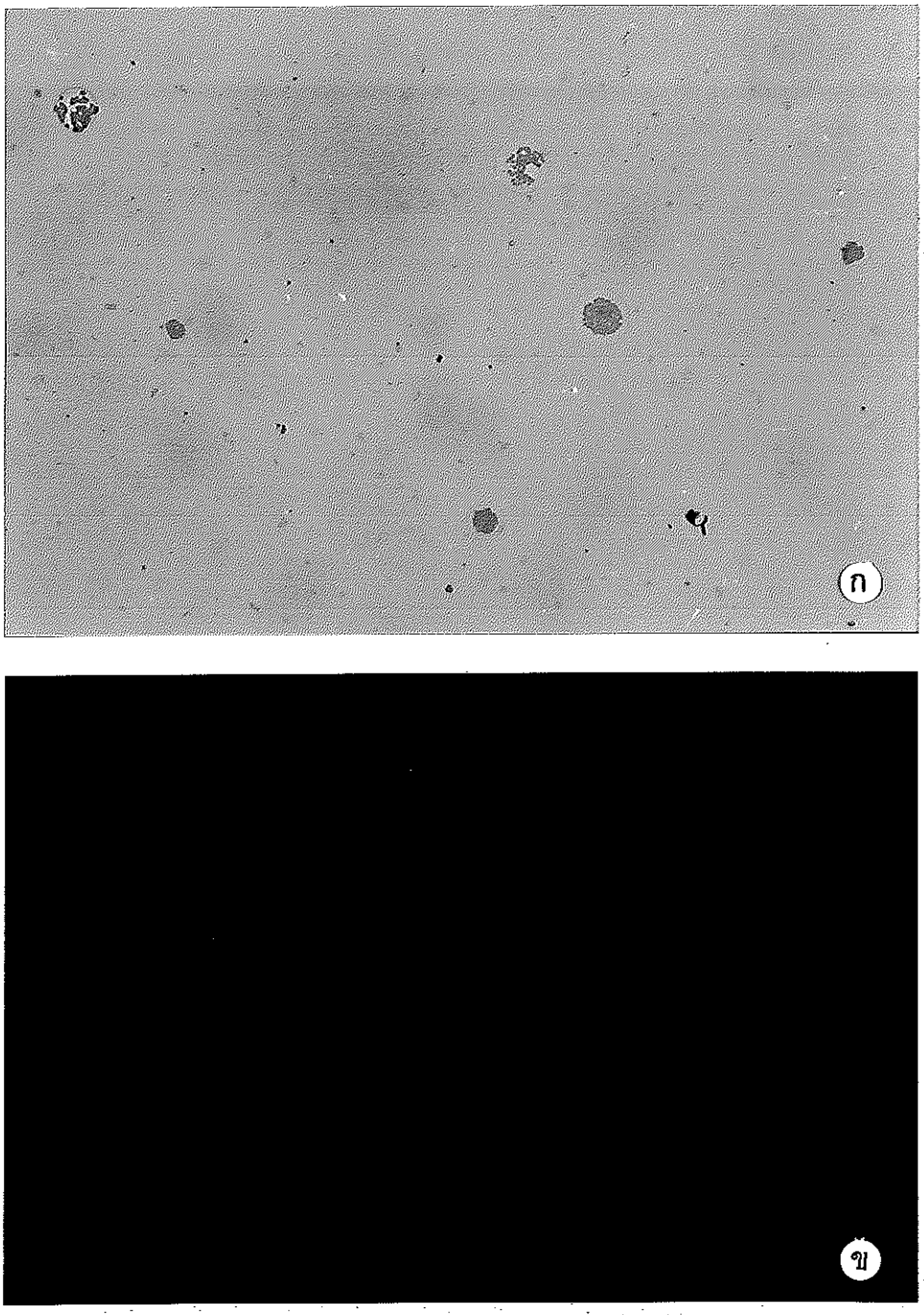
ข. โปรโตพลาสต์จากใบจริงจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง (x400)



**ภาพที่** 2 โปรโตพลาสต์จากใบจริงจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุก (x300) แยกในสารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ก. ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเต็ด

ข. ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเรืองแสงสี




**ภาพที่** 3 โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงส้มจุก (x100) แยกในสารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ก. ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเต็ด

ข. ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเรืองแสงสีเขียวเหลือง

2. ระยะเวลาการอินคิวเบท

จากการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่า ช่วงเวลาต่าง ๆ ให้ผลการแยกโปรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) การใช้เวลา 4 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ สูงสุด คือ $1.52 \times 10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความมีชีวิต พบว่า การอินคิวเบทที่เวลาดังกล่าวให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุด คือ 49.22 เปอร์เซ็นต์ เวลาอินคิวเบท 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์รองลงมา คือ $9.20 \times 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้ความมีชีวิตสูงสุด คือ 81.43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอินคิวเบทใบส้มจุกร่วมกับสารละลายเอนไซม์ข้างต้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำสุด คือ $7.20 \times 10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 77.71 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ผลของระยะเวลาการอินคิวเบทต่อจำนวน และความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ [1]

| เวลาการอินคิวเบท (ชั่วโมง) | โปรโตพลาสต์ /กรัมน้ำหนักสด | ความมีชีวิต (%) |
|---|---|---|
| 2 | $7.20 \times 10^5$c | 77.71a |
| 3 | $9.20 \times 10^6$b | 81.43a |
| 4 | $1.52 \times 10^7$a | 49.22b |
| **เฉลี่ย** | $8.37 \times 10^6$ | 69.45 |
| F-test | ** | ** |
| C.V. (%) | 22.23 | 13.95 |

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

[1]สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์

3. ตำแหน่งใบต่อการแยกโปรโตพลาสต์

นำใบจริงส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง มาทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วย เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ อินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** ผลของตำแหน่งใบต่อความสามารถในการแยกโปรโตพลาสต์[1]

| ตำแหน่งใบ | โปรโตพลาสต์ /กรัมน้ำหนักสด | ความมีชีวิต (%) |
|---|---|---|
| ใบคู่ที่ 1 | $6.14 \times 10^6$ | 88.40 |
| ใบคู่ที่ 2 | $7.50 \times 10^6$ | 87.65 |
| เฉลี่ย | $6.82 \times 10^6$ | 88.03 |
| T-test | ns | ns |
| C.V. (%) | 22.29 | 9.82 |

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

[1]สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์

4. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์จำนวนเริ่มต้น $1 \times 10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ โดยวิธีต่าง ๆ วางเลี้ยงในที่มืดให้ผลดังนี้

4.1 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงหรือลอยเดี่ยวในอาหาร เม็ดคลอโรพลาสต์มีสีเขียว ไซโทพลาสซึมเข้มข้น เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์แตก เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวตกตะกอนที่ก้นจากเพาะเลี้ยงในปริมาณมาก โปรโตพลาสต์ไม่มีการแบ่งเซลล์ เมื่อวางเลี้ยงต่อไป ไม่พบการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น เมื่อนำไปตรวจสอบความมีชีวิต พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลง และตายหมดในที่สุด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวแบบหยดแขวน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์ยังคงมีลักษณะกลม เต่ง เหมือนการเพาะเลี้ยงในวิธีที่ 4.1 แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่า ช่องว่างอากาศ (vacuole) มีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไซโทพลาสซึมภายในโปรโตพลาสต์มีน้อยมาก หรือเกือบไม่มีเลย ช่องว่างอากาศขยายใหญ่จนเต็มเซลล์ โปรโตพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ตายในที่สุด

4.3 การฝังเลี้ยงในอาหารแข็งโดยใช้วุ้นอากาโรส พบว่า หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์มีลักษณะเหมือนวิธีที่ 4.1 เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ช่องว่างอากาศใหญ่เต็มเซลล์ เม็ดคลอโรพลาสต์กระจายเต็มอาหารวุ้น และไม่พบการแบ่งเซลล์ใด ๆ

4.4 การฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยใช้วุ้นไฟต้าเจล เข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง ไซโทพลาสซึมเข้มข้น เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวเต็มเซลล์ โดยบางเซลล์เริ่มมีลักษณะรี แสดงว่ามีการสร้างผนังเซลล์เพื่อเข้าสู่วงจรการแบ่งเซลล์ สังเกตพบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์

จากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเป็นวิธีที่ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาต่อไปถึงความหนาแน่นในการเลี้ยง ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสม จึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

**5. ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงต่อพัฒนาการ**

ผลจากตารางที่ 4 พบว่า การวางเลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่นเริ่มต้นต่ำ โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาน้อย โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาดีที่สุดโดยเฉพาะการแบ่งเซลล์ตามปกติ เมื่อเพาะเลี้ยงความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเพิ่มความหนาแน่นเป็น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแตกหน่อมากกว่า

การเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารสูตรกึ่งแข็งกึ่งเหลว MS เติมผงวุ้นไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่การฝังเลี้ยงในวุ้นอากาโรสไม่ส่งเสริมให้มีการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในวุ้นไฟต้าเจลส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัว และพัฒนาสั้นกว่าการฝังเลี้ยงในวุ้นอากาโรส (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของความหนาแน่น และวิธีการเลี้ยงต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์[1]

| ชนิดวุ้น | ความเข้มข้น (%) | พัฒนาการ | ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | $1x10^4$ | $1x10^5$ | $1x10^6$ |
| อากาโรส | 0.6 | การแบ่งเซลล์ | 0 | 0 | 0 |
| | | การแตกหน่อ | 0 | 0 | 0 |
| ไฟต้าเจล | 0.15 | การแบ่งเซลล์ | + | ++ | + |
| | | การแตกหน่อ | + | + | ++ |

+ พัฒนา 0-5 %, ++ พัฒนา 5-10 %

[1] อาหารสูตร MS เติม ซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์

ดังนั้นในการทดลอง ศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เรื่องต่อไป จึงเลือกจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

**6. ผลของแหล่งโปรโตพลาสต์ต่อพัฒนาการ**

ผลจากตารางที่ 5 พบว่า แหล่งของโปรโตพลาสต์มีผลต่อพัฒนาการและระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใบจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดสังเกตพบการแบ่งเซลล์หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 และ 20 วัน ตามลำดับ โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาการ 2 ลักษณะ คือ การแบ่งเซลล์ กล่าวคือ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจากรูปร่างกลมบริเวณตรงกลางเซลล์มีการสร้างเซลล์เพลทมากั้น (ภาพที่ 4) ส่วนพัฒนาการแบบแตกหน่อคล้ายกับลักษณะแรก เซลล์มีลักษณะรี แต่ไม่มีการสร้างเซลล์เพลท (ภาพที่ 5)

เมื่อวางเลี้ยงต่อไป สังเกตพบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงบางโปรโตพลาสต์มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น มีแนวโน้มจะมีพัฒนาการและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ต่างจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบของต้นกล้าที่เพาะเมล็ด อย่างไรก็ตามเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นไซโทพลาสซึมมีความเข้มข้นน้อยลง และไม่มีการเจริญเติบโตใด ๆ

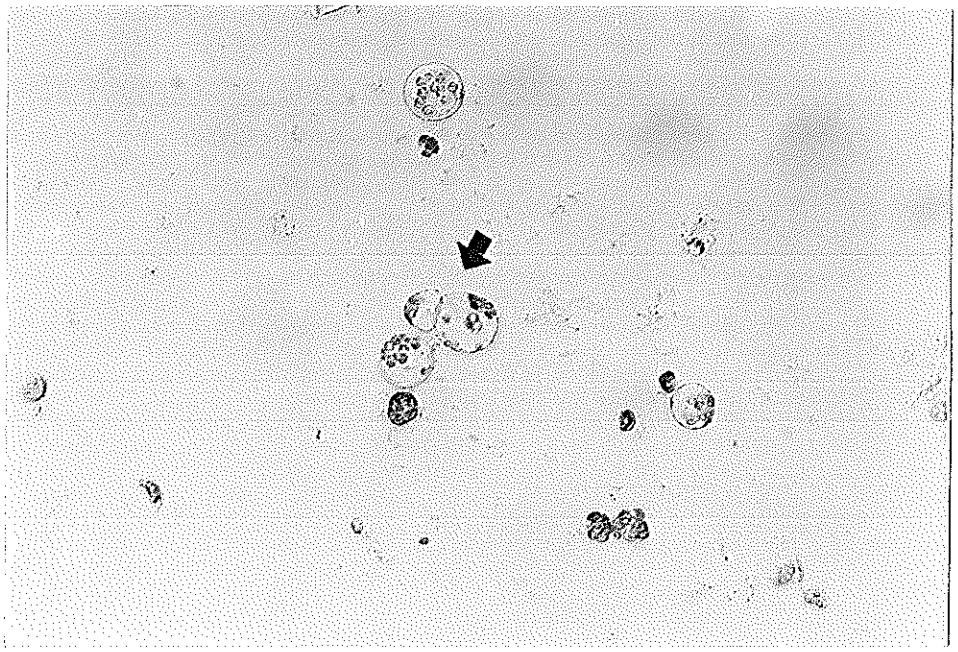
ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบเลี้ยงสังเกตพบการแบ่งเซลล์หลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ (ภาพที่ 6) เมื่อวางเลี้ยง

ต่อไป พบว่า ช่องว่างอากาศขยายใหญ่เต็มเซลล์ โปรโตพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

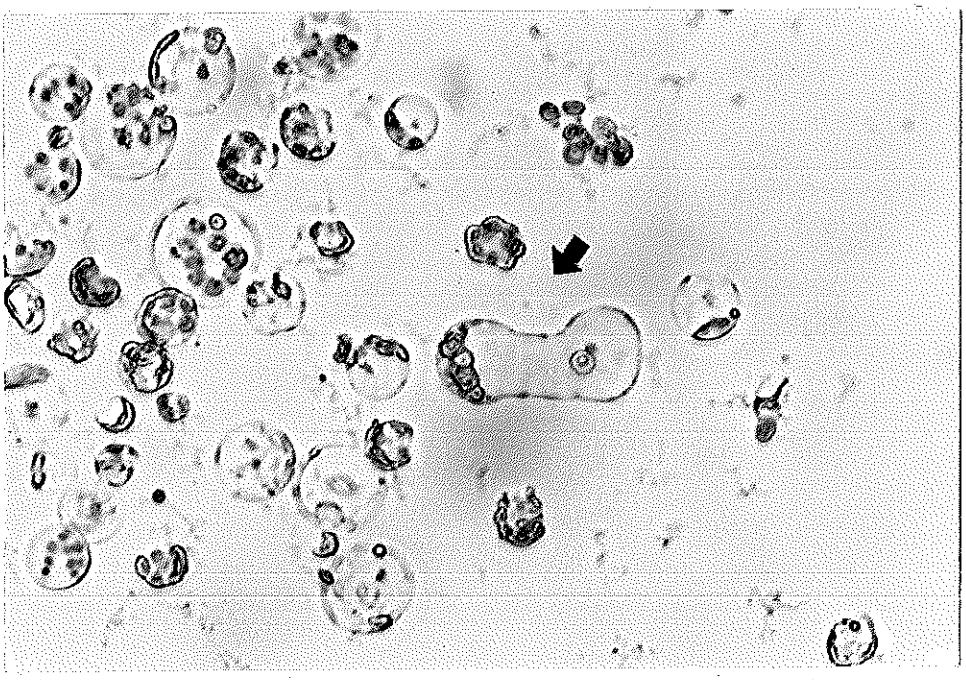
**ตารางที่ 5** ผลของโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์[1]

| แหล่งของโปรโตพลาสต์ | พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%) | | ระยะเวลา (วัน) |
|---|---|---|---|
| | การแบ่งเซลล์ | การแตกหน่อ | |
| ใบเลี้ยง | 0 | 4.00 | 7 |
| ใบจริง | 9.19 | 14.26 | 20 |
| ใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง | 13.33 | 5.88 | 7 |

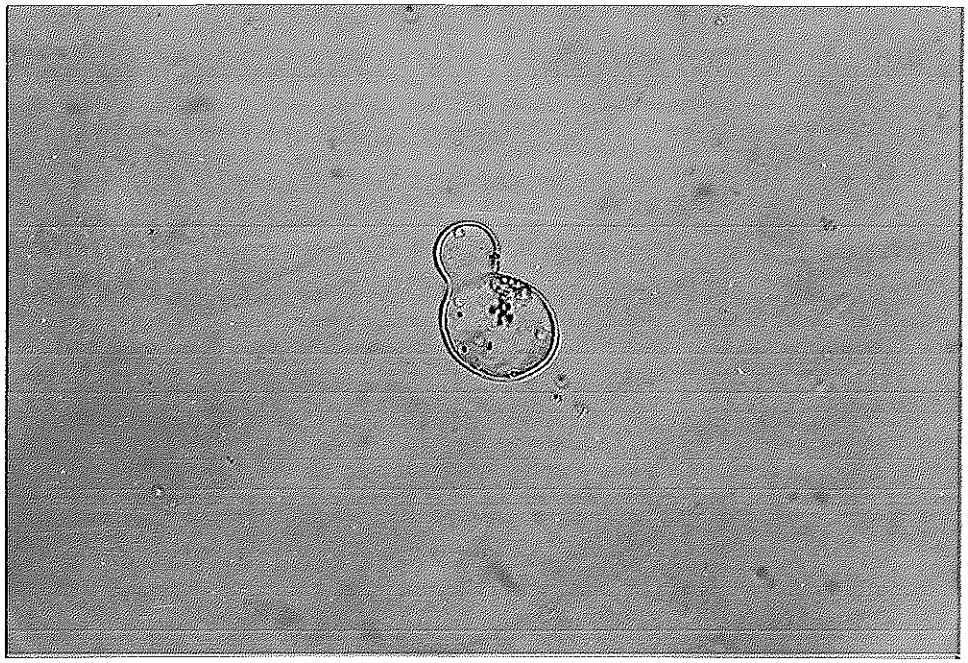
[1] โปรโตพลาสต์ทั้งหมดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม ซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ NAA เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์



ภาพที่ 4 การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง (ศรชี้) (x300) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจล ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน



**ภาพที่** 5 การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบจริงส้มจุก (ศรชี้) (x300) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจล ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 20 วัน



**ภาพที่** 6 การแตกหน่อของโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงส้มจุก (x300) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจล ในอาหารสูตร MS เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน

ตารางที่ 6 ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

| สูตรอาหาร | NAA | BA | พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | --มิลลิกรัม/ลิตร-- | | การแบ่งเซลล์ | การแตกหน่อ |
| MS | 0.5 | 1.0 | 8.33 | 0 |
| | | 2.0 | 20.83 | 0 |
| | | 3.0 | 5.00 | 0 |
| | | 4.0 | 4.55 | 0 |
| | | 5.0 | 6.67 | 0 |
| MS | 1.0 | 1.0 | 13.31 | 7.69 |
| | | 2.0 | 18.68 | 3.62 |
| | | 3.0 | 7.69 | 5.26 |
| | | 4.0 | 10.00 | 4.55 |
| | | 5.0 | 13.33 | 5.88 |
| MT | 0.5 | 1.0 | 4.26 | 0 |
| | | 2.0 | 29.92 | 0 |
| | | 3.0 | 6.87 | 0 |
| | | 4.0 | 7.57 | 0 |
| | | 5.0 | 12.24 | 0 |
| MT | 1.0 | 1.0 | 10.00 | 18.52 |
| | | 2.0 | 14.65 | 9.09 |
| | | 3.0 | 7.14 | 6.67 |
| | | 4.0 | 8.92 | 6.22 |
| | | 5.0 | 16.47 | 7.63 |

8. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium*

จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเหลวสูตร MT เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าภายหลังการวางเลี้ยงเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงทุกระยะเวลาการเลี้ยงร่วม เมื่อศึกษาผลของพลาสมิดภายใน *Agrobacterium* ภายหลังการปลูกถ่ายยีน และวางเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า การเลี้ยงร่วมกับโปรโตพลาสต์ด้วยสายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ทุกระยะเวลาการเลี้ยงร่วมให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงกว่าชุดเปรียบเทียบ ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 การเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 5 นาที โปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดมากที่สุด (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามเมื่อวางเลี้ยงต่อไป พบว่า โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงและตายหมดในที่สุดในทุกหน่วยการทดลอง และจากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS ไม่พบการแสดงออกในโปรโตพลาสต์ที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ทั้งสองพลาสมิดและชุดเปรียบเทียบ

**ตารางที่ 7** ผลของระยะเวลาการเลี้ยงร่วมและชนิดพลาสมิดใน *Agrobacterium* ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์หลังการวางเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

| *Agrobacterium* | ระยะเวลาการเลี้ยงร่วม (นาที) | ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (%) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลาต่าง ๆ (ชม.) ± S.E. | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 24 | 48 | 72 |
| Control | | 81.11 ± 2.96 | 56.37 ± 10.31 | 50.83 ± 1.39 |
| LBA4404 | 5 | 78.18 ± 3.95 | 67.57 ± 3.05 | 64.36 ± 4.94 |
| (pBI121) | 10 | 75.22 ± 3.02 | 67.78 ± 1.39 | 63.79 ± 2.45 |
| | 15 | 67.50 ± 3.79 | 58.57 ± 2.35 | 56.49 ± 2.41 |
| **เฉลี่ย** | | 73.63 ± 3.59 | 64.64 ± 2.26 | 61.55 ± 3.27 |
| LBA4404 | 5 | 76.54 ± 1.34 | 49.19 ± 4.45 | 50.03 ± 4.81 |
| (pARK5) | 10 | 65.52 ± 3.45 | 52.76 ± 4.42 | 62.17 ± 2.63 |
| | 15 | 72.37 ± 4.78 | 52.52 ± 3.64 | 49.02 ± 3.11 |
| **เฉลี่ย** | | 71.48 ± 3.19 | 51.49 ± 4.17 | 53.74 ± 3.31 |

S.E. = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

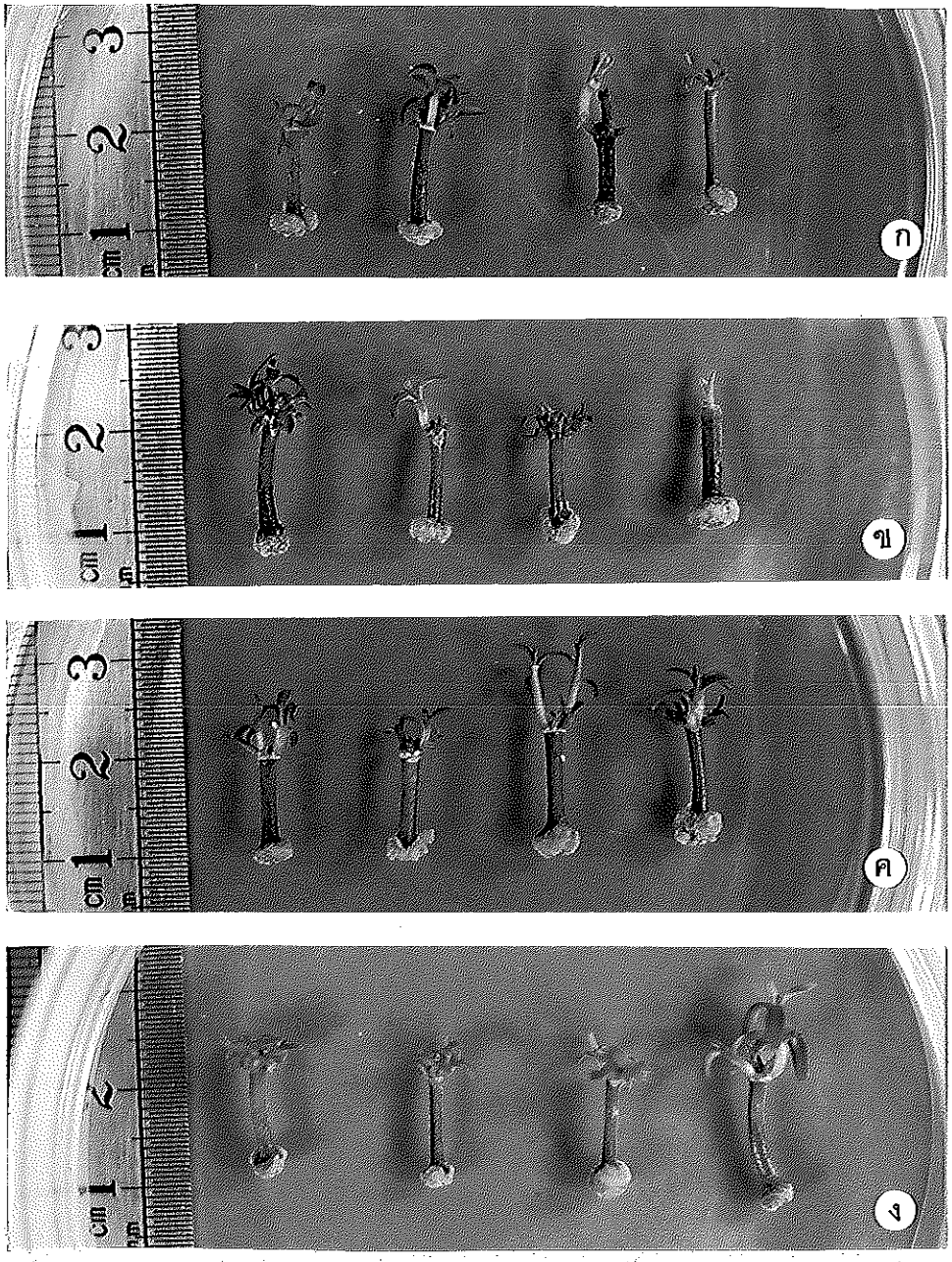
**9. ผลของการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง**

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มจุกบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วหยดเชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ LBA4404 หรือสายเชื้อ EHA101 วางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่หยดด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 ให้จำนวนยอดรวม ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดสูงกว่าหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ในขณะที่การปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ให้การสร้างยอดรวมต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบ และน้อยกว่า LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ดังนั้น *Agobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 มีประสิทธิภาพในการสร้างยอดสูงกว่า (ตารางที่ 8 ภาพที่ 7) อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจกิจกรรมของ GUS ในเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายไม่พบการแสดงออกจากทั้งสองสายเชื้อ เมื่อนำยอดใหม่ที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ยอดใหม่ของชุดเปรียบเทียบทั้งสองสายเชื้อ และยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วยสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 มีสีซีด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วยสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 69.57 เปอร์เซ็นต์ และยอดมีสีซีด 21.74 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8 และ 9)

**ตารางที่ 8** จำนวนและเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงต้นกล้าส้มจุกที่เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายเชื้อต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจผลหลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

| *Agrobacterium* | จำนวนยอดรวมเฉลี่ย/ชิ้นส่วน ± S.E. | ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) ± S.E. | % ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอด ± S.E. | กิจกรรมของ GUS |
|---|---|---|---|---|
| Control (YEB) | 2.63 ± 1.38 | 0.22 ± 0.00 | 75.00 ± 6.45 | - |
| LBA4404(pBI121) | 3.51 ± 0.94 | 0.23 ± 0.03 | 93.33 ± 4.22 | - |
| Control (LB) | 3.70 ± 0.70 | 0.19 ± 0.03 | 100.00 ± 0.00 | - |
| EHA101(pIG121) | 1.97 ± 0.78 | 0.16 ± 0.03 | 50.00 ± 16.12 | - |

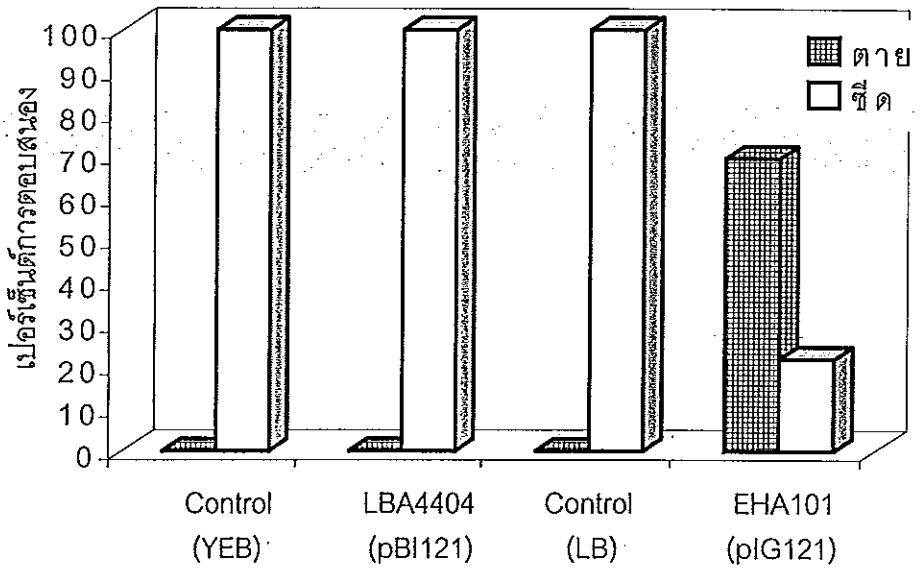
S.E. = ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน



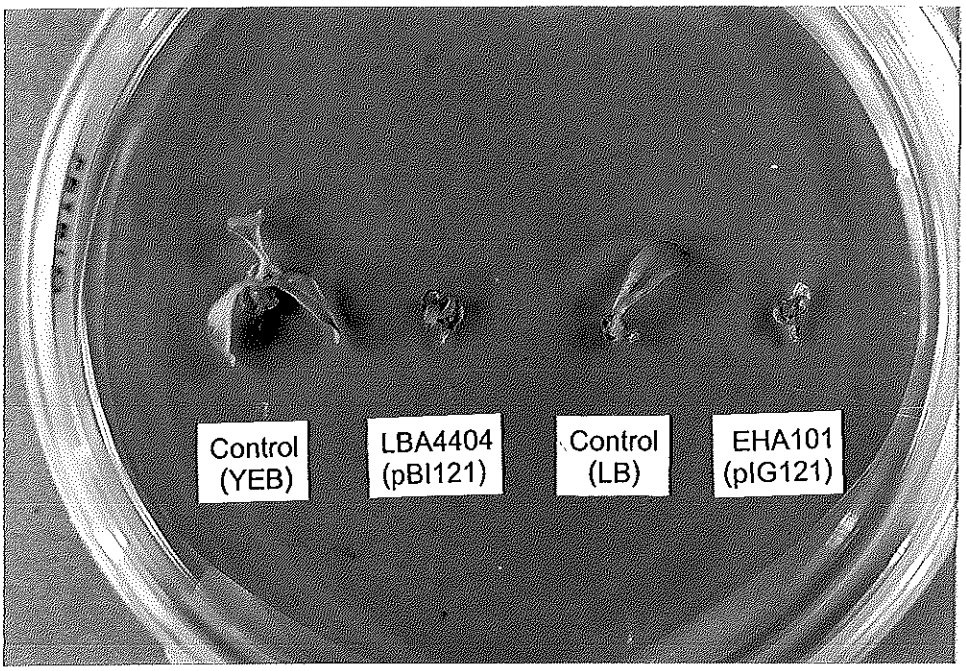

**ภาพที่ 7** ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* แล้วเลี้ยงร่วมบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. Control (YEB) ข. สายเชื้อ LBA4404 (pBI121)

ค. Control (LB) ง. สายเชื้อ EHA101 (pIG121)



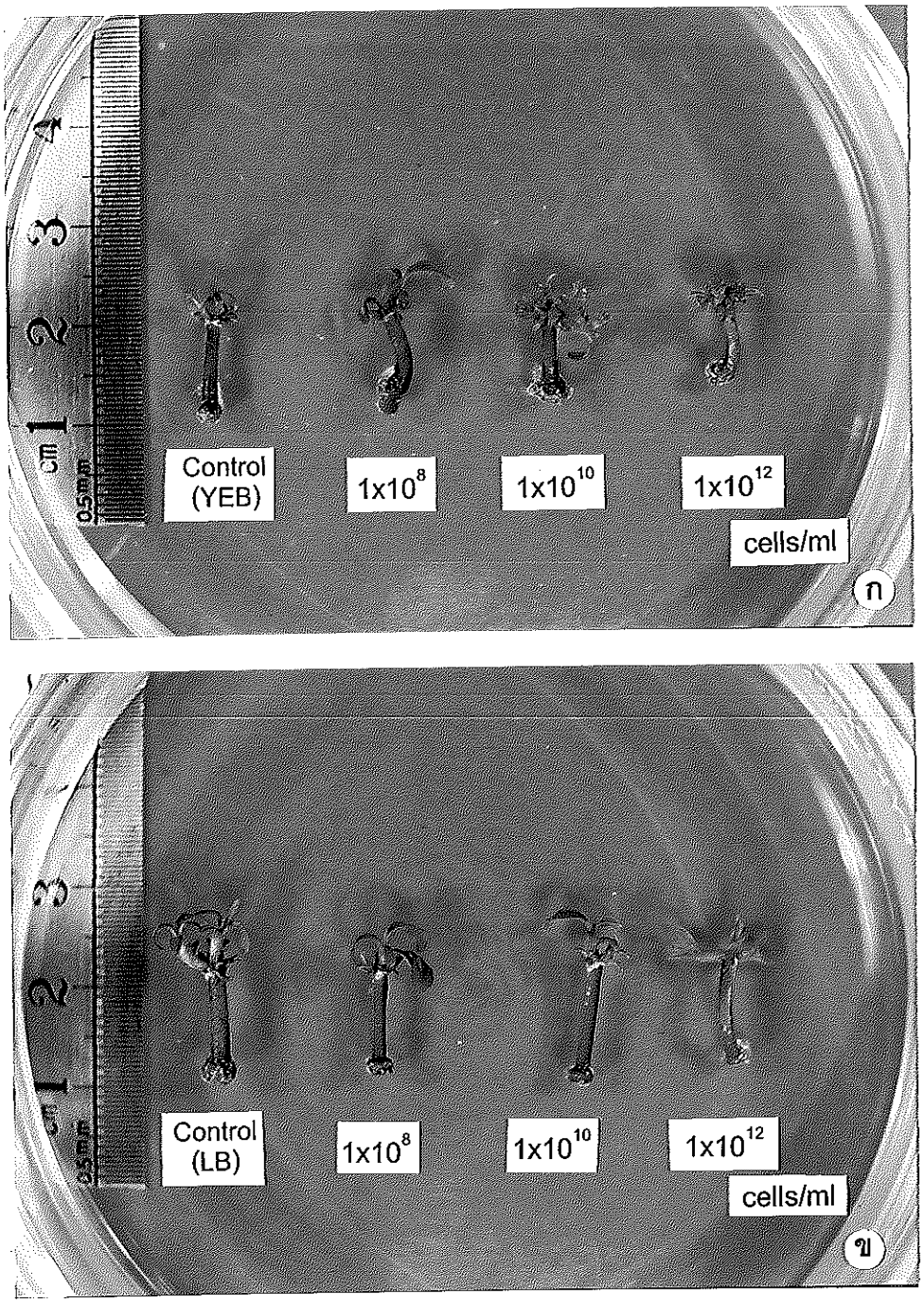

**ภาพที่ 8** เปอร์เซ็นต์การตายและซีดของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) และ EHA101 (pIG121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน




**ภาพที่** 9 ยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุกด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) และ EHA101 (pIG121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

**10. ผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง**

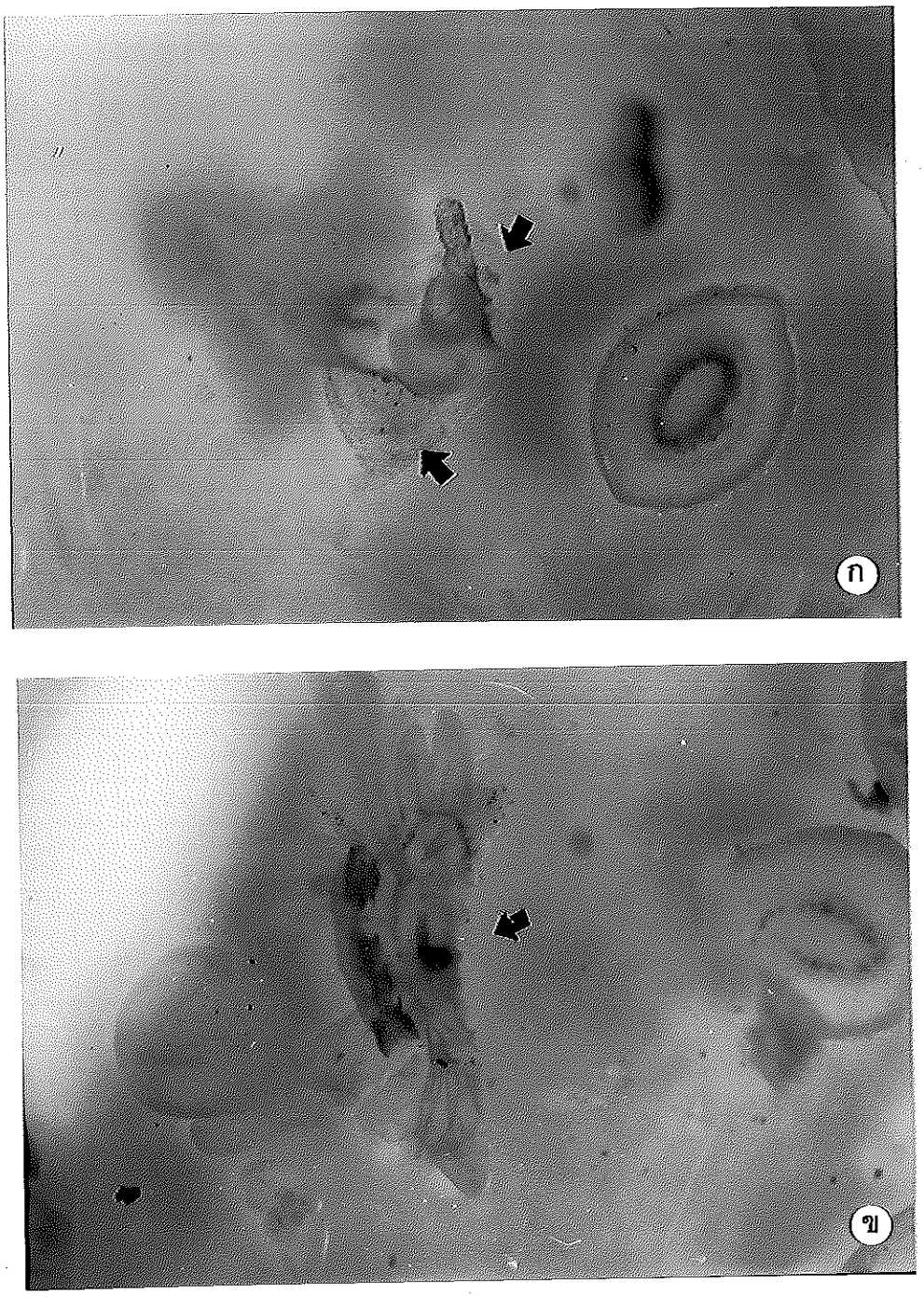
จากการเลี้ยงชิ้นส่วนเหนือใบเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* 2 สายเชื้อ ที่ความหนาแน่น $1x10^8$, $1x10^{10}$ และ $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.67 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 0.22 เซนติเมตร และการสร้างยอด 78.22 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าสายเชื้อ EHA101 (ตารางที่ 9 ภาพที่ 10) แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งสองสายเชื้อให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบ ส่วนความหนาแน่นเชื้อที่เหมาะสม พบว่า ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของทั้งสองสายเชื้อให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอดรวมสูงสุด รองลงมา คือ ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นไปในทำนองเดียวกันทั้งสองสายเชื้อ เมื่อพิจารณาจำนวนยอดรวม พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 4.15±0.74 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 3.92±0.08 ยอดต่อชิ้นส่วน ในทำนองเดียวกับกิจกรรมของ GUS พบการแสดงออกในลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 เฉพาะความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ตรวจพบกิจกรรมการแสดงออกของ GUS ในลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 11) และเมื่อนำยอดใหม่ที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ยอดใหม่จากชุดเปรียบเทียบของทั้งสองสายเชื้อมีสีซีด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยอดมีเปอร์เซ็นต์การตาย สูงสุด 46.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ความหนาแน่น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยอดมีเปอร์เซ็นต์การตาย 40.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) ส่วนยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยอดมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ความหนาแน่น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยอดมีเปอร์เซ็นต์การตาย 64.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) สำหรับลักษณะของยอดใหม่หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน แสดงในภาพที่ 14




**ภาพที่ 10** ยอดรวมจากลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

ก. สายเชื้อ LBA4404 (pBI121)

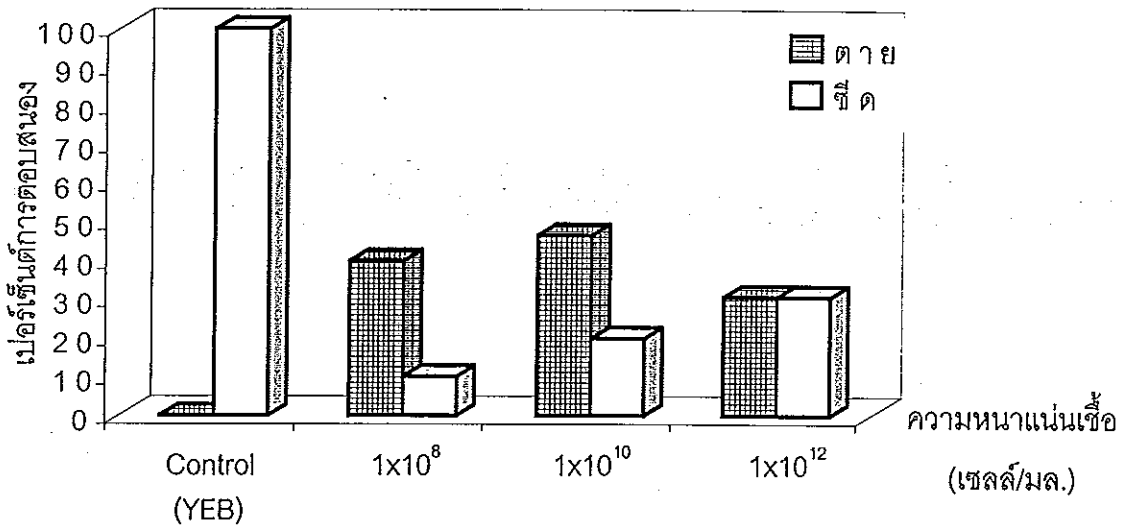
ข. สายเชื้อ EHA101 (pIG121)



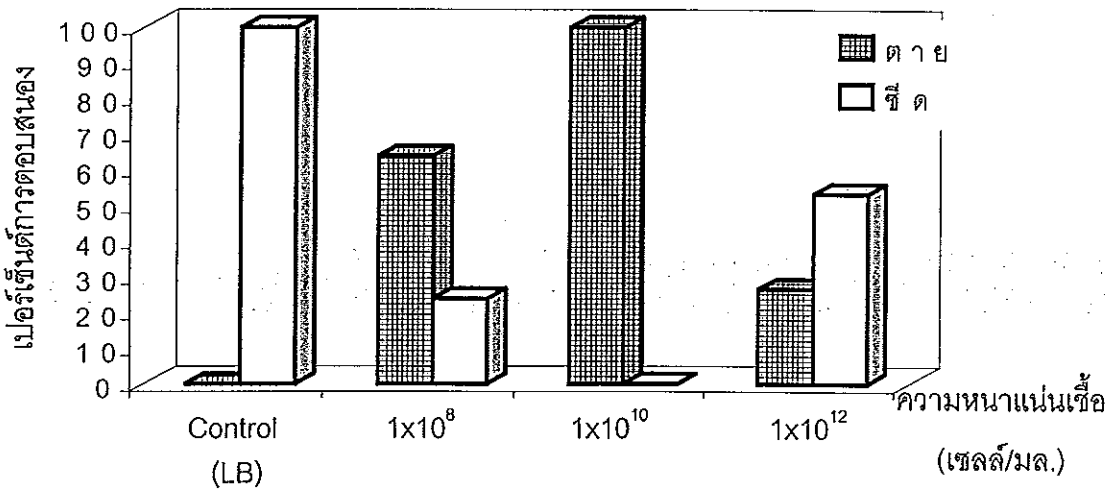

**ภาพที่ 11** กิจกรรมของ GUS (ศรชี้) ในลำต้นเดิมหลังการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* เป็นเวลา 1 เดือน บนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (x50)

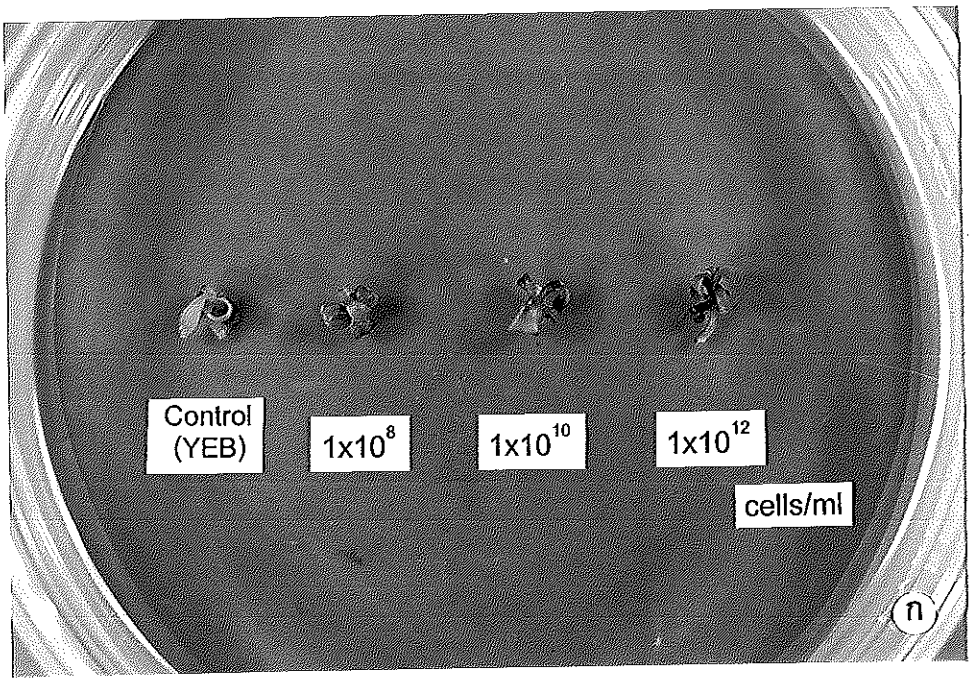
ข. สายเชื้อ EHA101 (pIG121) ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (x24)

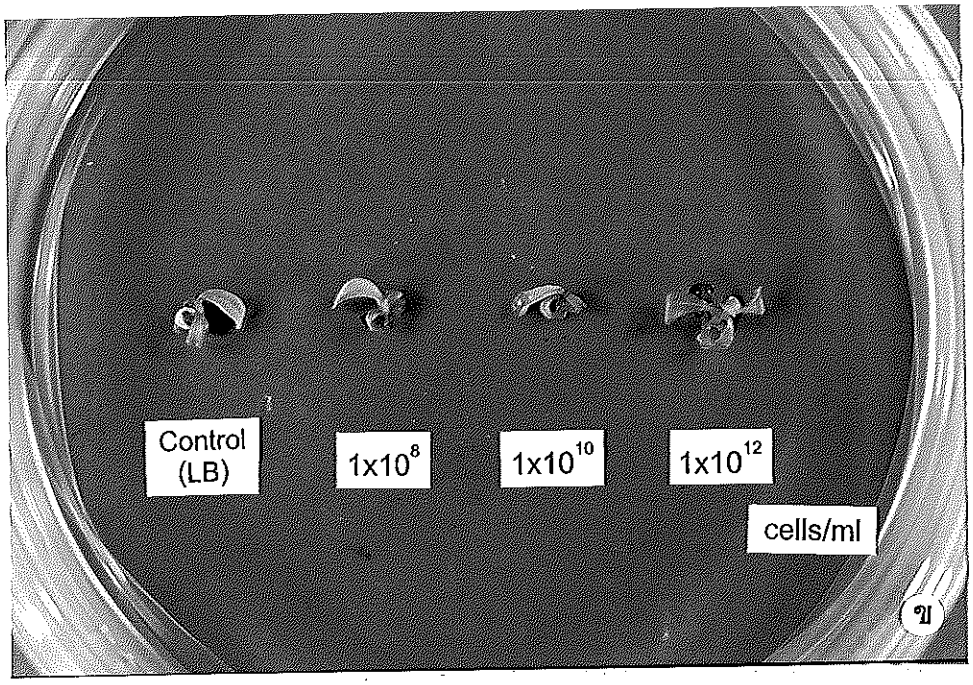



**ภาพที่** 12 เปอร์เซ็นต์การตายและชีดของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน




**ภาพที่** 13 เปอร์เซ็นต์การตายและชีดของยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 (pIG121) หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน




**ภาพที่** 14 ยอดใหม่จากการปลูกถ่ายยีนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุกด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อและความหนาแน่นต่างกัน หลังคัดเลือกบนอาหารสูตร MS เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

ก. สายเชื้อ LBA4404 (pBI121)

ข. สายเชื้อ EHA101 (pIG121)

11. ผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบ

จากการเลี้ยงแผ่นใบส้มจุกร่วมกับ *Agrobacterium* สองสายเชื้อ คือ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ที่ความหนาแน่น 3 ระดับ ร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator พบว่า การเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสภาพการให้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด คือ 73.35 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเลี้ยงแผ่นใบร่วมกับสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยไม่ใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 52.00 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงร่วมระหว่างการใช้และไม่ใช้ sonicator พบว่า การใช้ sonicator ร่วมในการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบทั้งสองสายเชื้อให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสเฉลี่ยสูงกว่าการไม่ใช้ sonicator อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบจากชุดเปรียบเทียบของทั้งสองสายเชื้อในหน่วยทดลองที่ไม่ใช้ sonicator สูงกว่าการเลี้ยงแผ่นใบร่วมกับ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อทุกระดับความเข้มข้น นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัสสูงกว่าด้วย (ตารางที่ 10) จากการตรวจสอบกิจกรรมของ GUS หลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ พบจุดสีฟ้า (blue spot) เฉพาะการเลี้ยงร่วมด้วยวิธีการใช้ sonicator ด้วยสายเชื้อ LBA4404 ที่ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสายเชื้อ EHA101 ที่ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 15 และ 16) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการตายของแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* รวมทั้งชุดเปรียบเทียบด้วย

ตารางที่ 10 ผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบส้มจุกร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator หลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดจากมอลท์ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

| สายเชื้อ *Agrobacterium* | ความหนาแน่น (เซลล์/มิลลิลิตร) | น้ำหนักแคลลัส (มิลลิกรัม) | % ชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัส | กิจกรรม GUS %(จุด/ชิ้นส่วน) 1 สัปดาห์ | 3 สัปดาห์ |
|---|---|---|---|---|---|
| without sonicator | | | | | |
| Control (YEB) | | ++++ | 85.50 | - | - |
| LBA4404 | $1x\ 10^8$ | +++ | 52.00 | - | - |
| (pBI121) | $1x\ 10^{10}$ | - | 0.00 | - | - |
| | $1x\ 10^{12}$ | - | 0.00 | - | - |
| | **เฉลี่ย** | | 17.23 | | |
| with sonicator | | | | | |
| Control (YEB) | | ++++ | 80.23 | - | - |
| LBA4404 | $1x\ 10^8$ | ++ | 35.00 | - | - |
| (pBI121) | $1x10^{10}$ | + | 15.55 | - | - |
| | $1x10^{12}$ | + | 25.00 | - | 3.33(1) |
| | **เฉลี่ย** | | 25.18 | | |
| without sonicator | | | | | |
| Control (LB) | | ++++ | 84.95 | - | - |
| EHA101 | $1x\ 10^8$ | ++ | 53.25 | - | - |
| (pIG121) | $1x10^{10}$ | ++ | 30.00 | - | - |
| | $1x10^{12}$ | ++ | 56.94 | - | - |
| | **เฉลี่ย** | | 46.65 | | |

ตารางที่ 10 (ต่อ)

| สายเชื้อ *Agrobacterium* | ความหนาแน่น (เซลล์/มิลลิลิตร) | น้ำหนักแคลลัส (มิลลิกรัม) | % ชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัส | กิจกรรม GUS %(จุด/ชิ้นส่วน) 1 สัปดาห์ | 3 สัปดาห์ |
|---|---|---|---|---|---|
| with sonicator | | | | | |
| Control (LB) | | ++++ | 81.82 | - | - |
| EHA101 | $1x\ 10^{8}$ | ++ | 73.35 | - | - |
| (pIG121) | $1x\ 10^{10}$ | + | 56.67 | 16.67(9) | 6.67(3) |
| | $1x\ 10^{12}$ | + | 15.74 | - | - |
| | เฉลี่ย | | 48.59 | | |

น้ำหนักแคลลัส - 0 มิลลิกรัม กิจกรรมของ GUS - = negative

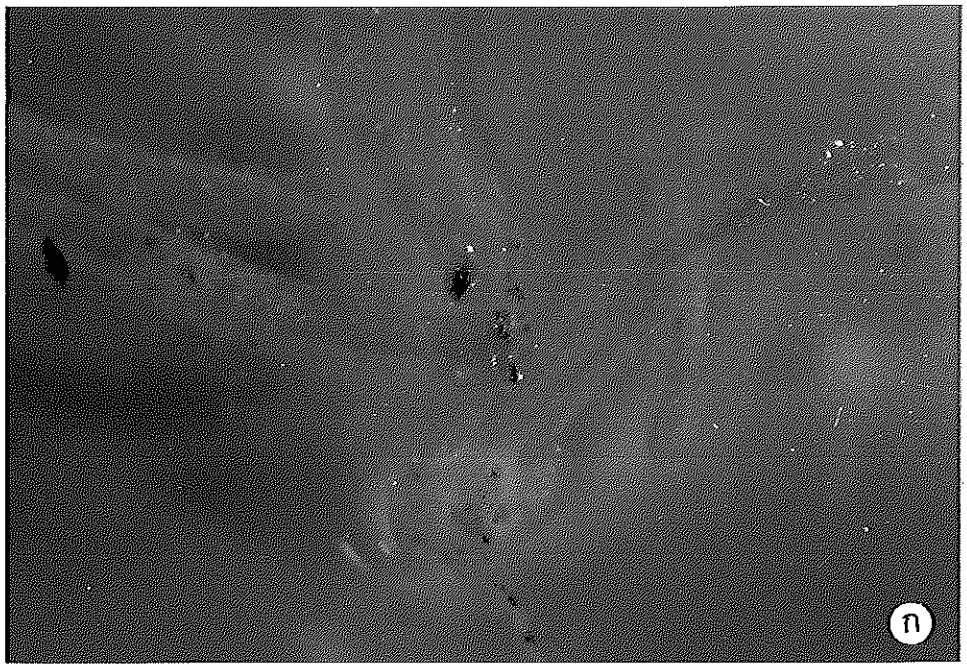
\+ 1-20 มิลลิกรัม

++ 21-25 มิลลิกรัม

+++ 26-30 มิลลิกรัม

++++ 31-40 มิลลิกรัม

**ภาพที่ 15** กิจกรรมของ GUS (blue spot) หลังการเลี้ยงแผ่นใบร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 (pBI121) ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (x30)



**ภาพที่** 16 กิจกรรมของ GUS (blue spot) หลังการเลี้ยงแผ่นใบร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 (pIG121) ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ก) (x30) และ 3 สัปดาห์ (ข) (x62.5)

# บทที่ 4

# วิจารณ์

## 1. การแยกโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์สามารถทำได้ด้วยวิธีกล (mechanical isolation) และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) Power และคณะ (1976) พบว่า การใช้เอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์พิทูเนียมีผลดี คือ ทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก การหดตัวของไซโทพลาสซึมเนื่องจากความดันออสโมติคมีน้อย และโปรโตพลาสต์ที่ได้มีความมีชีวิตสูง เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์มีด้วยกัน 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มเซลลูเลส เช่น เซลลูเลส ไดรซีเลส และเซลลูไลซิน กลุ่มเฮมิเซลลูเลส เช่น เฮมิเซลลูเลส และโรไซม์ และกลุ่มเพคติเนส เช่น เพคติเนส มาเซอโรไซม์ และเพคโตไลเอส (Evans and Bravo, 1983) ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นกับชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์ (2534) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชันของโกโก้ได้ $4.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ความมีชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอนไซม์ไดรซีเลส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ เพียงชนิดเดียว ทำนองเดียวกับรายงานของ พัฐวดี ทองสีดำ (2536) แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนกล้วยไม้อะแรนด้าจักก๊วนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เพียงชนิดเดียวได้โปรโตพลาสต์จำนวน $3.6x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่พืชหลายชนิดต้องการเอนไซม์ผสม 2 ชนิดขึ้นไปเพื่อแยกโปรโตพลาสต์ Te-chato (1997) รายงานว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขก ต้องใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด $2.6x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองนี้ ได้ใช้เอนไซม์ผสม 3 ชนิด คือ เพคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลอง พบว่า การใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ความเข้มข้นต่ำให้โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตมากกว่าการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง สอดคล้องกับการทดลองของ สมปอง เตชะโต (2530) ซึ่งรายงานว่า การใช้เอนไซม์ดังกล่าวเข้มข้นสูงส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจากใบถั่วฝักยาวลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในองค์ประกอบของเอนไซม์ดังกล่าวยังมี เอนไซม์โปรทิเอสและนิวคลิเอส

ซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ด้วย และจากการทดลองนี้ พบว่า มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อการทำให้เซลล์แยกเป็นอิสระง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์

ในขณะที่ Grosser และ Chandler (1987) แยกโปรโตพลาสต์จากใบจากแปลงปลูกของส้ม *Citrus aurantium* L. พืชสกุลใกล้เคียงกับส้ม คือ *Severinia buxifolia* Poir. Ten. และ *Poncirus trifoliata* L. Raf. และลูกผสมระหว่างส้มกับพืชสกุลใกล้เคียง คือ *C. paradisi* กับ *P. trifoliata* และลูกผสมระหว่าง *C. sinensis* กับ *P. trifoliata* โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เพคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอเรส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 2-6x$10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักสดใบ 1 กรัม Shimizu และคณะ (1985) อ้างโดย Kuri (1988) รายงานว่า การเติมเพคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบองุ่น แต่ในการศึกษานี้ต้องใช้เอนไซม์เพคโตไลเอสวาย-23 ความเข้มข้นสูงกว่านี้ คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก Ishii และ Yokotsuka (1975) อ้างโดย Grezes และคณะ (1994) รายงานว่า เพคโตไลเอสวาย-23 ความบริสุทธิ์สูงสกัดได้จากเชื้อรา *Aspergillus japonicus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ endopolygalacturonase และ endopectinlyase ซึ่งสามารถทำลายพันธะ α–1-4 glycosidic ของสารเพคติน ดังนั้นการใช้เพคโตไลเอส วาย-23 ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์) มีผลให้เกิดรอยรั่วบริเวณพลาสมาเมมเบรน ทำให้โปรโตพลาสต์ตายได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์จะทำงานได้ดีหรือไม่นั้นยังขึ้นกับปัจจัยอื่นหลายประการ เช่น ชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ แม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่นำมาจากแหล่งต่างกัน คุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่ได้ก็แตกต่างกัน ในการศึกษานี้ พบว่า เพคโตไลเอส วาย-23 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการย่อยโปรโตพลาสต์จากใบจริงที่เพาะเมล็ดได้ดีกว่าใบเลี้ยงและใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) กล่าวว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบพืชจากแปลงปลูกมีจำนวนและความมีชีวิตน้อยกว่าใบในหลอด เนื่องจากในขั้นตอนการแยกด้วยเอนไซม์มีผลึกของแคลเซียม ออกซาเลท (calcium oxalate) ถูกแยกออกมาพร้อมโปรโตพลาสต์ทำให้โปรโตพลาสต์แตก เป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษานี้ การแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุกนอกหลอดทดลองโดยการใช้เอนไซม์ชนิดและความเข้มข้นเดียวกับการใช้แยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุกในหลอดทดลอง ให้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย (ไม่แสดงข้อมูล) และแตกเนื่องจากผลึกของแคลเซียม ออกซาเลท สำหรับไม้ผลอื่น ๆ เช่น แอปเปิ้ล Ai-Ping และคณะ (1995) สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนและความมีชีวิตสูงจาก ใบเลี้ยง ใบจากการเพาะเลี้ยงยอดในหลอดทดลอง และใบจากแปลงปลูก อย่างไรก็ตาม ที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจากหลอดทดลอง และจากการทดลองนี้ ถึงแม้สามารถแยก

โปรโตพลาสต์ได้เป็นจำนวนมากและความมีชีวิตสูง แต่เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง พบว่า โปรโตพลาสต์ที่ได้มีการพัฒนาน้อย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการใช้เอนไซม์ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชในการแยกโปรโตพลาสต์ ในการศึกษาต่อไปจึงอาจมีการศึกษาถึงองค์ประกอบและความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์ผสมชนิดอื่นเพื่อนำมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากสูตรอาหารและวิธีการเพาะเลี้ยง จึงอาจมีการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุกในอาหารสูตรต่าง ๆ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำการแบ่งเซลล์พัฒนาเป็นโคโลนี แคลลัส และพืชต้นใหม่ต่อไป

เมื่อทราบชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ส้มจุก นำข้อมูลที่ได้มาศึกษาระยะเวลาการอินคิวเบทที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่า การอินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เหมาะสำหรับแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก การอินคิวเบทเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สั้นเกินไปทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนน้อย ในขณะที่การใช้เวลานานขึ้น (4 ชั่วโมง) ส่งเสริมให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้น แต่จะทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา (2537) ซึ่งรายงานว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการอินคิวเบทนานขึ้น เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เริ่มลดลง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกออกมาได้มีโอกาสถูกย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ได้นานขึ้น จึงทำให้โปรโตพลาสต์แตกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Grosser และ Chandler (1987) รายงานว่าต้องใช้เวลาการอินคิวเบทนาน 10-15 ชั่วโมง ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบจากแปลงปลูกของส้มและพืชตระกูลใกล้เคียง โดยการใช้เอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเพคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอเรส เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการอินคิวเบทยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดและเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์

การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ทำได้โดยการนำโปรโตพลาสต์ไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต โมเลกุลของสีจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในโปรโตพลาสต์ หากเป็นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ทำให้เกิดสีฟลูออเรสเซนส์ (fluorescein) เกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียว เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ (Power and Davey, 1990) เมื่อโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง โอกาสที่โปรโตพลาสต์จะเจริญแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัสย่อมมีสูงเพิ่มขึ้นด้วยเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อไป ดังนั้นเทคนิคนี้มีความเหมาะสมในเบื้องต้นเพื่อการเลือกแหล่งโปรโตพลาสต์ที่ดี มีความแข็งแรงไม่แตกง่าย ทนทานอยู่ในสาร

ละลายเอนไซม์ได้ดี ตลอดจนสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อายุของใบที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ต่างจากรายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากถั่วฝักยาวพันธุ์ มก. 7 โดย สมปอง เตชะโต (2530) พบว่าความอ่อนแก่ของใบมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป Kao และ Michayluk (1980) กล่าวว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบคู่ที่ 1 นับจากยอดของอัลฟัลฟ่าให้จำนวน ความมีชีวิต ตลอดจนค่าการเจริญของโปรโตพลาสต์สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบคู่ที่ 2, 3 และ 4 มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) รายงานว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบกล๊อกซิเนียที่มีความยาวมากกว่า 2.5 เซนติเมตร หรือใบแก่ มีเม็ดคลอโรพลาสต์หนาแน่น ช่องว่างอากาศน้อย เหมาะสมแก่การนำไปเพาะเลี้ยง ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอ่อน หรือใบที่มีความยาวน้อยกว่า 2.5 เซนติเมตร อ่อนแอและแตกง่าย Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) รายงานว่า อายุของใบมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากองุ่น โดยโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอ่อนมีความสามารถในการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบแก่หรือใบจากนอกหลอดทดลอง ทำนองเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชัน Grezes และคณะ (1994) รายงานว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จำนวนและคุณภาพดีจากเซลล์ซัสเพนชันของกาแฟซึ่งอยู่ในระยะการเจริญแบบเส้นตรง (4-10 หลังการย้ายเลี้ยง) เซลล์มีรูปร่างกลม ผนังเซลล์บาง และมีช่องว่างอากาศขนาดเล็ก

**2. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก**

เนื่องจากโปรโตพลาสต์ไม่มีผนังเซลล์ ในอาหารเพาะเลี้ยงจึงต้องเติมออสโมติคัมลงไปด้วย ในทำนองเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์ และโดยทั่วไปความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ใช้เพาะเลี้ยงเท่ากับออสโมติคัมที่ใช้แยก จากการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทั้ง 4 วิธี พบว่า โปรโตพลาสต์เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยใช้ไฟต้าเจล เข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ถูกตรึงกระจายในอาหารวุ้นได้รับสารอาหารเท่ากันทุกเซลล์ ทำให้สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และแบ่งเซลล์ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Te-chato (1997) รายงานว่า การเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขกแบบฝังเลี้ยงในผงวุ้นไฟต้าเจล ส่งเสริมการแบ่งตัวของโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวและการพัฒนาก็สั้นกว่าการ

เลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารเติมวุ้นอากาโรส ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งแม้ว่าเป็นวิธีที่โมเลกุลของสารอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง แต่จากการทดลองนี้เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน พบว่า โปรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก มีการปลดปล่อยของเสียจากเซลล์ทับถมกันทำให้โปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายหมดในที่สุด แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้ (จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์, 2534) ซึ่งมีรายงานว่า โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่หลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 8 วัน และแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มโคโลนี หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กฤษณา สุดทะสาร (2541) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารเหลว โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่และแบ่งเซลล์ได้ดี ในการทดลองนี้ เพื่อป้องกันการทับถมกันของโปรโตพลาสต์ ได้ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวแบบหยดแขวน ซึ่งให้ผลการทดลองไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นชั้นบาง ๆ (2-3 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง) ในขณะที่ Ohgawara และคณะ (1985) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่าง *Citrus sinensis* กับ *Poncirus trifoliata* ในอาหารเหลวแบบหยดตั้ง ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ลูกผสมได้ดี ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุกในอาหารแข็งโดยใช้วุ้นอากาโรสในการทดลองนี้ พบว่า โปรโตพลาสต์ไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) ซึ่งรายงานว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบมักมีเยื่อหุ้มเซลล์บางและแตกง่าย การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งทำให้โปรโตพลาสต์แตกหรือไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากโมเลกุลของสารอาหารถูกยึดเกาะอยู่กับวุ้นแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ยาก โปรโตพลาสต์จึงไม่สามารถพัฒนาและแบ่งเซลล์ได้ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารแข็งอากาโรสทำให้โปรโตพลาสต์ถูกตรึงอยู่กับที่ และมีการแพร่ของเสียจากเซลล์ออกมาทับถมกันในอาหารวุ้นเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ ทำให้ไม่สามารถสร้างผนังเซลล์หรือแบ่งเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหรือเซลล์ซัสเพนชันของส้มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเติมอากาโรส (Vardi *et al.*, 1982; Kobayashi *et al.*, 1985; Ling *et al.*, 1989)

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์แต่ละโปรโตพลาสต์มีการแพร่สารเมตาบอไลต์ (metabolite) ที่สร้างลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสารเหล่านี้จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao and Michayluk, 1975) โดยทั่วไปความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง $1x10^4$-$1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้

ขึ้นอยู่กับชนิดและสรีรวิทยาของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ในขณะนั้น (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) Hidano และ Nuzeki (1988) รายงานว่า ความหนาแน่นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลอยู่ระหว่าง $1x10^5$ – $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน และมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-10 วัน การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่นมากเกินไป ทำให้โปรโตพลาสต์แก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน แต่หากน้อยเกินไปโปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญได้ จากการทดลองนี้ พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มพันธุ์อื่น ๆ (Kobayashi *et al.*, 1983; Ohgawara *et al.*, 1985; Kunitake *et al.*, 1991) นอกจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้ม ยังมีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในพืชชนิดอื่น ๆ อีก เช่น การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้อะแรนด้าจักก๊วน (พัฐวดี ทองสีดำ, 2536) พืชตระกูลกะหล่ำ (Zhao *et al.*, 1995) patchouli (*Pogosteman cablin* Benth.) (Kageyama *et al.*, 1995) ข้าว (กฤษณา สุดทะสาร, 2541) และส้มแขก (Te-chato, 1997) เป็นต้น ในขณะที่จากการทดลองของ Hidaka และ Kajiura (1988) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มพันธุ์ Washington navel orange ความหนาแน่นเริ่มต้นต่ำ คือ $2x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และสร้างเอ็มบริออยด์ได้ดี Jumin และ Nito (1995) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ orange jessamin (*Murraya paniculata*) ความหนาแน่นเริ่มต้น $3\text{-}5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์หลังวางเลี้ยง เป็นเวลา 13 วัน อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนต้องใช้ความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โปรโตพลาสต์จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (Theodoropolos and Roubelakis-Angelakis, 1990) แต่จากการทดลองนี้ พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ความหนาแน่น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของส้มจุก

จากการศึกษาผลของแหล่งโปรโตพลาสต์ต่อพัฒนาการ พบว่า โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีพัฒนาการต่ำที่สุด และเป็นการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ เมื่อวางเลี้ยงต่อไป พบว่า ช่องว่างอากาศขยายใหญ่เต็มเซลล์ และโปรโตพลาสต์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตายหมดในที่สุด แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงแอปเปิ้ลซึ่งมีการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ (Ai-Ping *et al.*, 1995) Zhao และคณะ (1995) รายงาน

ว่า โปรโตพลาสต์ซึ่งแยกจากใบเลี้ยงของพืชตระกูลกะหล่ำสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดี แต่จากการทดลองนี้ พบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ได้ดีและเร็วกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบจริง และใบเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจาก ใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงเป็นใบที่อ่อน จึงมีเนื้อเยื่อเจริญเป็นจำนวนมากและมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง นอกจากนี้ยังมีการดูดแร่ธาตุและสารอาหารจากอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสะสมไว้ในใบพร้อมสำหรับการเจริญเติบโตหรือแบ่งเซลล์ต่างจากใบจากต้นกล้าเพาะเมล็ดที่มีการใช้อาหารสะสมในเมล็ดและอาหารเพาะเลี้ยงปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต Theodoropolos และ Roubelakis-Angelakis (1990) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบอ่อนซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงข้อในหลอดทดลอง มีความสามารถในการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีกว่าโปรโตพลาสต์ซึ่งแยกจากใบที่ได้จากนอกหลอดทดลองหรือใบที่ได้จากการเพาะเมล็ด

ชนิดอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ซึ่งโดยทั่วไปอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไป แต่ต้องเติมออสโมติคัมเพื่อควบคุมความดันออสโมติค จนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ จากผลการทดลองนี้ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุกเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบฝังวุ้นไฟต้าเจลในอาหารสูตร MS และ MT ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การเจริญเติบโตและพัฒนาการใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของส้มมีน้อย โดยส่วนใหญ่เป็นรายงานการเพาะเลี้ยงลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์จากใบกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหรือเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของส้มหรือระหว่างส้มกับพืชสกุลใกล้เคียง เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสหรือเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันมีความสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ได้ดีกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบ รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมของส้มมีทั้งจากการสร้างลูกผสมด้วยวิธีการใช้ PEG เช่น Ohgawara และคณะ (1985) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่าง *Poncirus trifoliata* กับส้มพันธุ์ Trovita ในอาหารเหลวสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมซูโครส เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ในขณะที่ Kobayashi และคณะ (1991) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่าง F.N. Washington navel orange กับ Murcott tanger ในอาหารแข็งสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมซูโครส เข้มข้น 0.6 โมลาร์ และผงวุ้นอากาโรส 0.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างลูกผสมในส้มด้วยวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า

แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกลูกผสมสูตร MT ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมซูโครส เข้มข้น 0.6 โมลาร์ และวุ้นอากาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ Grosser และ Chandler (1987) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบของส้ม และลูกผสมระหว่างส้มกับพืชตระกูลใกล้เคียงในอาหารเหลวสูตร BH3 (citrus leaf protoplast culture medium) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ในการศึกษานี้ พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงสามารถเข้าสู่วงจรการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยง 7 วัน โดยมีการแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MT เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม เมื่อวางเลี้ยงต่อไป พบว่า ไม่สามารถชักนำให้มีการแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มโคโลนีได้ ในขณะที่มีรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส หรือเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันว่าไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารที่เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ก็สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสหรือพืชต้นใหม่ได้ (Kobayashi *et al.*, 1985; Ling *et al.*, 1990) ทั้งนี้เพราะโปรโตพลาสต์จากแหล่งดังกล่าวมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น มีลักษณะเป็นเซลล์เอ็มบริโอเริ่มต้นอาจมีการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตได้เองไม่จำเป็นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตจากภายนอก ในขณะที่โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป อาจทดลองใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นอื่น หรือใช้วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุกร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (nurse culture) ของพืชชนิดอื่น เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก

### 3. การปลูกถ่ายยีน

การปรับปรุงพันธุ์ส้มด้วยวิธีการมาตรฐานมีข้อจำกัดเนื่องจากการเป็นหมัน การผสมตัวเองไม่ติด และระยะเวลานานก่อนเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์ จากการประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโดยสามารถชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสหรือออร์แกโนเจเนซิสจากการเพาะเลี้ยงนิวเซลลัสและเนื้อเยื่ออื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถชักนำแคลลัสหรือพืชต้นใหม่จากการรวมโปรโตพลาสต์ของส้มบางพันธุ์ (Vardi and Galun, 1988) อย่างไรก็ตาม ส้มพันธุ์การค้าบางพันธุ์ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการปรับปรุงพันธุ์ส้มด้วยวิธีการปลูกถ่ายยีน ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ การปลูกถ่ายยีนโดยตรงเข้าสู่โปรโตพลาสต์และการปลูกถ่ายโดยผ่านตัวกลาง คือ *Agrobacterium* ซึ่ง De Cleene และ

De Ley (1976) อ้างโดย Gardner (1993) รายงานว่า ส้มเป็นพืชอาศัยของ *Agrobacterium* ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* ในพืชตระกูลส้มมีอยู่หลายประการด้วยกัน เช่น แหล่งวัสดุพืช สภาพของชิ้นส่วน วิธีการเลี้ยงร่วม สายเชื้อ *Agrobacterium* และพลาสมิด การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการคัดเลือกพืชที่ผ่านการปลูกถ่ายยีน และความสามารถในการสร้างรากจากยอดที่ผ่านการปลูกถ่ายยีน (Moore *et al.*, 1993) ในการทดลองนี้มีการศึกษาผลของการปลูกถ่ายยีนกับโปรโตพลาสต์ ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง และแผ่นใบส้มจุก ผลการปลูกถ่ายยีนกับโปรโตพลาสต์ พบว่า เมื่อวางเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบมีเยื่อหุ้มเซลล์บาง ทำให้แตกง่าย นอกจากนี้ *Agrobacterium* อาจปล่อยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ ในขณะที่ Kobayashi และ Uchimiya (1989) ประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยตรงเข้าสู่โปรโตพลาสต์ ซึ่งแยกได้จากเซลล์ซัสเพนซันของส้มพันธุ์ Trovita ด้วยวิธีการนำโปรโตพลาสต์เลี้ยงร่วมกับ DNA ภายใต้การให้ PEG แล้วเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ได้รับ DNA ในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วยวิธีเดียวกันนี้ Vardi และคณะ (1990) ปลูกถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของส้ม rough lemon และได้พืชต้นใหม่ที่ผ่านการปลูกถ่ายยีน จำนวน 2 ต้น การปลูกถ่ายยีนกับโปรโตพลาสต์ส้มจุกไม่สามารถใช้วิธีเลี้ยงร่วมกับ PEG ได้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีผนังเซลล์บางดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และ PEG มีความหนืดทำให้เป็นอันตรายต่อเซลล์ นอกจากส้มแล้วยังมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* กับโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนซันของข้าวบาร์เลย์ (Zhang *et al.*, 1995) โดยใช้พลาสมิด pCaMVI1CN และ pDW2 เลี้ยงร่วมกับโปรโตพลาสต์และ PEG พบว่า โปรโตพลาสต์มีการแสดงออกกิจกรรมของ *cat* เมื่อตรวจสอบการปลูกถ่ายยีนแบบชั่วคราว และโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนของข้าวบาร์เลย์พันธุ์ Dissa และ Igri มีการสร้างแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเติม G418 และคานามัยซิน ซัลเฟต

จากการศึกษาผลของการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง ในการศึกษานี้โดยวิธีการหยดเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ แล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารคัดเลือก เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอดสูงกว่าสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตาม ไม่พบกิจกรรมของ GUS จากชิ้นส่วนที่ปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ ขณะที่ Moore และคณะ (1993) ปลูกถ่ายยีนกับลำต้นส้ม Carrizo citrange ด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pMON9793 แล้ววางเลี้ยงบนอาหารเติมและไม่เติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า หลังการปลูกถ่ายยีนแล้ว

เลี้ยงบนอาหารไม่เติมคานามัยซินชิ้นส่วนให้การสร้างยอด 79.00 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเลี้ยงบนอาหารเติมคานามัยซินให้การสร้างยอด 66.00 เปอร์เซ็นต์ และพบการแสดงออกของ GUS เท่ากัน คือ 0.90 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองดังกล่าว พบว่า ยอดใหม่ที่ชักนำได้มากกว่า 90.00 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบกิจกรรมของ GUS แต่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก แตกต่างจากผลการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบว่า เมื่อนำยอดที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ยอดส้มจุกมีสีซีดและตายเมื่อวางเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากการปลูกถ่ายยีนเป็นไปได้น้อย ทำให้ยอดที่พัฒนาไม่สามารถต้านทานต่อคานามัยซินได้ หรืออาจมีการปลูกถ่ายได้แต่ไม่มีการแสดงออก เนื่องจากระบบโปรโมเตอร์ไม่เหมาะสมต่อการถอดรหัส

จากการศึกษาผลของชนิดและความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง พบว่า ทั้งสองสายเชื้อให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดต่ำกว่าชุดเปรียบเทียบ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *Agrobacterium* ปลดปล่อยสารพิษไปยับยั้งการสร้างยอด การศึกษาผลของความหนาแน่นเชื้อในการทดลองนี้ พบว่า ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของทั้งสองสายเชื้อ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดและจำนวนยอดสูงสุด รองลงมา คือ ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 พบกิจกรรมของ GUS เฉพาะความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 พบกิจกรรมของ GUS เฉพาะความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่สนธยา หนูด้วง (2541) ปลูกถ่ายยีนกับลำต้นส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun) ด้วยวิธีการหยด *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1.2x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า มีการสร้างยอดรวมมากที่สุด 43.33 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการทดลองดังกล่าวไม่พบกิจกรรมของ GUS ทำนองเดียวกับการปลูกถ่ายยีนกับลำต้น carrizo citrange (Pena *et al.*, 1995b) ด้วยวิธีการหยดเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด p35SGUSINT ความหนาแน่น $4x10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่พบกิจกรรมของ GUS และไม่ได้ยอดที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร การปลูกถ่ายยีนในส้มและพืชอื่น ๆ มีการเลือกใช้ความหนาแน่นเชื้อใกล้เคียงกัน เช่น การปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นส้มสามใบด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่นเชื้อ $5x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีการสร้างยอด 35.6 เปอร์เซ็นต์ และพบการกิจกรรมของ GUS 55.40 เปอร์เซ็นต์ (Kaneyoshi *et al.*, 1994) และการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นพลับจีน ใช้ความหนาแน่นเชื้อเท่ากัน คือ $5x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ *Agrobacterium* สายเชื้อต่าง ๆ พบกิจกรรมของ GUS ในยอดใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉพาะการ

ปลูกถ่ายยีนด้วยสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pSMK251 และมีประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีน 11.10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนด้วยสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือพลาสมิด pTOK233 (Nagamura *et al.*, 1998) ในกรณีการปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้น lime ใช้ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงร่วมโดยการใช้ tamato feeder plate และคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีน 82.00 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของ GUS ในยอดที่ชักนำได้ (Pena *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ความหนาแน่นเชื้อต่ำในรายงานข้างต้น เพื่อสะดวกในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน เนื่องจากเป็นการปลูกถ่ายยีนด้วยวิธีการจุ่มแช่เชื้อ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ การปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ความหนาแน่นต่ำ ($1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ไม่พบกิจกรรมของ GUS เป็นไปในทำนองเดียวกันทั้งสองสายเชื้อ การปลูกถ่ายยีนกับชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงส้มจุกด้วยวิธีการหยดเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่นเชื้อที่เหมาะสมที่สุด คือ $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่นเชื้อที่เหมาะสมที่สุด คือ $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเพื่อเพิ่มความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนในการศึกษาครั้งต่อไปอาจเติมสารอะซิโตไซริงกอนร่วมในระหว่างการปลูกถ่ายยีน หรือภายหลังการปลูกถ่ายยีนแล้วนำไปเลี้ยงในสภาพให้เซลล์พี่เลี้ยง เช่น ยาสูบ (tobacco feeder plate) เพื่อช่วยกระตุ้นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืช

ผลของความหนาแน่นเชื้อ *Agrobacterium* ต่อการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบร่วมกับการใช้และไม่ใช้ sonicator ในการศึกษานี้ พบว่า การเลี้ยงร่วมแผ่นใบกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่นเชื้อ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสภาพการให้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงสุด คือ 73.35 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) ขณะที่การเลี้ยงร่วมกับสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ที่ความหนาแน่นเดียวกัน โดยไม่ใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 52.00 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของ GUS เฉพาะการเลี้ยงร่วมด้วยวิธีการใช้ sonicator กับสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถเลี้ยงและเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบร่วมกับการใช้ sonicator ในส้มและพืชอื่น คงมีเพียงรายงานการใช้ sonicator ร่วมกับ *Agrobacterium* เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนกับเซลล์ซัสเพนชันและใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง (Trick and Finer, 1998; Santarem *et al.*, 1998) ผลของคลื่นเสียงจาก sonicator ทำให้มีการเพิ่มแผล

ขนาดเล็ก (microwounding) ส่งเสริมการเกาะของแบคทีเรียและการส่ง T-DNA ได้เพิ่มมากขึ้น Norelli และคณะ (1996) รายงานว่า การสร้างแผลมีผลต่อความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด p35SGUS_INT กับใบแอปเปิล โดยการทำแผลยาว 200 มิลลิเมตร กับชิ้นส่วนใบด้วยการใช้ปากคีบ พบกิจกรรมของ GUS เป็น 10 เท่า ของใบที่ไม่ได้ทำแผล และพบกิจกรรมของ GUS เป็น 4.40 เท่า ของใบที่ทำแผล ยาว 3-5 มิลลิเมตร ด้วยมีด ส่วนการใช้เครื่องดูดสูญญากาศ (vacuum infiltration) ไม่มีผลส่งเสริมการแสดงออกของ GUS ทำนองเดียวกับในการศึกษานี้ พบว่า การทำแผลโดยใช้มีดกรีดผ่านเส้นกลางใบจำนวน 2 แผล ร่วมกับการใช้ sonicator ส่งเสริมการแสดงออกของ GUS เมื่อปลูกถ่ายยีนด้วยสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม นอกจากการทำแผลกับแผ่นใบแล้ว สายเชื้อ *Agrobacterium* ยังมีผลต่อกิจกรรมของ GUS Niu และคณะ (1998) พบกิจกรรมของ GUS ในการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบสะระแหน่ ด้วยสายเชื้อ EHA105 ที่มีพลาสมิด p35GUS_INT สูงกว่าสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBISN1 สำหรับในการศึกษานี้ เมื่อคัดเลือกโดยกิจกรรมของ GUS (blue spot) พบว่า ใบส้มจุกมีการตอบสนองต่อสายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ได้ดีกว่าสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ภายใต้สภาวะการใช้ sonicator

จากการศึกษาการปลูกถ่ายยีนกับแผ่นใบส้มจุกในการศึกษานี้ถึงแม้พบกิจกรรมของ GUS แต่เมื่อนำไปคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือชักนำพืชต้นใหม่บนอาหารคัดเลือกได้ ดังนั้นชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงจึงมีศักยภาพในการปลูกถ่ายยีนดีกว่าแผ่นใบและเหมาะสำหรับนำมาเป็นเครื่องมือในการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* เนื่องจากมีความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ถึงแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ต้นส้มจุกที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่ได้พืชจำลองพันธุ์ เนื่องจากยังมีความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนต่ำ เพื่อเพิ่มความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนในการศึกษาครั้งต่อไป อาจใช้วิธีการเลี้ยงร่วมโดยการจุ่มแช่เชื้อชิ้นส่วนลำต้นใน *Agrobacterium* ความหนาแน่นต่ำร่วมกับการใช้สารอะซิโตไซริงกอน หรือสภาพการให้เซลล์พี่เลี้ยง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีน

# บทที่ 5

# สรุป

**การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส้มจุก**

1. สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เพคโตไลเอส วาย-23 0.1 เปอร์เซ็นต์ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมาเซอโรไซม์ อาร์-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับความดันออสโมติคด้วยแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง ใบจริงจากต้นกล้าเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยงได้จำนวน $1.09x10^7$, $3.07x10^7$ และ $8.48x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และโปรโตพลาสต์ที่ได้มีความมีชีวิต 80.09, 85.86 และ 89.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. การอินคิวเบทใบร่วมกับสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด $9.20x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 81.43 เปอร์เซ็นต์

3. จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4. การฝังเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยใช้วุ้นไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์สามารถมีชีวิตรอดและมีพัฒนาการได้ดีที่สุด

5. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เติมไฟต้าเจล 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์สูงสุด 5-10 เปอร์เซ็นต์ และมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ 0-5 เปอร์เซ็นต์

6. โปรโตพลาสต์จากใบซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง มีการแบ่งเซลล์สูงสุด 13.33 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน รองลงมา คือ โปรโตพลาสต์จากใบจริงจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลอง มีการแบ่งเซลล์ 9.19 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ขณะที่โปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ 4.00 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

7. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารสูตร MT เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด 29.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ อาหารสูตร MS เติม NAA และ BA ความเข้มข้นเดียวกัน โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 20.83 เปอร์เซ็นต์

**การปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium***

8. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA44404 ที่มีพลาสมิด pBI121 เป็นเวลา 5 นาที ให้ความมีชีวิตรอดมากที่สุด 64.36±4.94 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

9. ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่หยดด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ให้ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอด 93.33±4.22 เปอร์เซ็นต์ ยอดมีสีซีด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่หยดด้วย *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ให้ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอด 50.00±16.12 เปอร์เซ็นต์ ยอดตาย 69.57 เปอร์เซ็นต์ และยอดมีสีซีด 21.74 เปอร์เซ็นต์ หลังนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 1 เดือน

10. *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดรวม 86.67±6.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างยอดรวม 75.00±18.93 เปอร์เซ็นต์ พบกิจกรรมของ GUS ในลำต้นเดิมที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไม่มียอดที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารเติมคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

11. การเลี้ยงแผ่นใบส้มจุกร่วมกับ *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 ความหนาแน่น $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 56.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเลี้ยงแผ่นใบร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121ความหนาแน่น $1x10^{12}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ sonicator ให้เปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัส 25.00 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของ GUS ในใบและแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ทั้งสองสายเชื้อ หลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารคัดเลือกเติมคานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้

12. จากการปลูกถ่ายยีนส้มจุก โดยวิธีการหยดเชื้อ *Agrobacterium* บริเวณปลายยอดของชิ้นส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยง มีแนวโน้มดีกว่าการปลูกถ่ายยีนโดยวิธีการเลี้ยงโปรโตพลาสต์หรือแผ่นใบร่วมกับ *Agrobacterium* ทั้งนี้เพราะ พบกิจกรรมของ GUS และสามารถชักนำพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนดังกล่าวได้

# เอกสารอ้างอิง


กฤษณา สุดทะสาร. 2541. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและโปรโตพลาสต์ของข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2539. เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช. สงขลา : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์. 2534. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โกโก้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสงค์ หนูแดง. 2540. ส้มจุกดี ๆ ที่จะนะ. *ใน* ศาสตร์แห่งส้ม. (บรรณาธิการ พาณิชย์ ยศปัญญา) หน้า 142-145. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มติชน.

พัฐวดี ทองสีดำ. 2536. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบันฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มงคล แซ่หลิม. 2536. การผลิตส้ม. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มยุรี วุฒิสิทธิ์. 2539. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล๊อกซิเนีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา. 2537. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์มะเขือเทศ. ว. แก่นเกษตร. 22 : 133-138.

สนธยา หนูด้วง. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco) และการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2530. การพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอในแคลลัสจากโปรโตพลาสต์ของใบถั่วฝักยาวพันธุ์ มก 7. ว. สงขลานครินทร์ 9 : 153-158.

Ai-Ping, D., W. Hong-Fan and C. Yu-Fen.1995. Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. Starkrimson). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40 : 145-149.

Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187 : 927-929.

Evans, D. A. and J. E. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture. *In* Handbook of Plant Cell Culture. Technique for Propagation and Breeding. (eds. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada) Vol. 1, pp. 124-176. New York : Macmillan Publishing Company.

Gardner, R. C. 1993. Gene transfer into tropical and subtropical crops. Scientia Horticulturae 55 : 65-82.

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

Grezes, J., D. Thomas and B. Thomasset.1994. Factor influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. Plant Cell, Tissue and Oragan Culture 36 : 91-97.

Grosser, J. W. and J. L. Chandler. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus* x *Poncirus* hybrid and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. Scientia Horticulturae 31 : 253-257.

Grosser, J. W. and F. G. Gmitter. 1990. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relative for germplasm enhancement and cultivar development. HortScience 25 : 147-151.

Grosser, J. W., G. A. Moore and F. G. Gmitter. 1989. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key' lime (*Citrus aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. Scientia Horticulturae 39 : 23-29.

Hidaka, T. and I. Kajiura. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. Scientia Horticulturae 34 : 85-92.

Hidaka, T., M. Omura, M. Ukagi, M. Tomiyama, A. Kato, M. Ohshima and F. Motoyoshi. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. Jpn. J. Breed. 40 : 199-207.

Hidano, Y. and M. Nuzeki. 1988. Protoplast culture of deciduous fruit trees. Scientia Horticulturae 37 : 301-306.

Jumin, H. B. and N. Nito. 1995. Embryogenic protoplast cultures of orange jessamine (*Murraya paniculata*) and their regeneration into plants flowering in vitro. Plant Cell, Tissue and Oragan Culture 41 : 277-279.

Kageyama, Y., Y. Honda and Y. Sugimura. 1995. Plant regeneration from patchouli protoplasts encapsulated in alginate beads. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41 : 65-70.

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

Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126 : 1.5-110.

Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol. 96 : 135-141.

Kobayashi, S. and H. Uchimiya. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. Jpn. J. Genet. 64 : 91-97.

Kobayashi, S., H. Uchimiya and I. Ikeda. 1983. Plant regeneration from 'Trovita' orange protoplasts. Japan. J. Breed. 33 : 119-122.

Kobayashi, S., I. Ikeda and H. Uchimiya. 1985. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 4 : 249-259.

Kobayashi, S., T. Ohgawara, I. Ohyama and S. Ishii. 1988. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma madarin (*C. unshiu*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14 : 63-69.

Kobayashi, S., T. Ohgawara, K. Fujiwara and I. Oiyama. 1991. Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between navel orange (*Citrus sonensis* Osb.) and 'Murcott' tangor. Theor. Appl. Genet. 82 : 6-10.

Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wullems and R. A. Schilperoort. 1982. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296 : 72-74.

Kunitake, H., H. Kagami and M. Mii. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'satsuma mandarin' (*Citrus unshiu* Marc.). Scientia Horticulturae 47 : 27-33.

Kurl, W.R. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops : small fruits. Scientia Horticulturae 37 : 231-245.

Ling, J. T., N. Nito and M. Iwamasa. 1989. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). Scientia Horticulturae 40 : 325-333.

Ling, J. T., N. Nito, M. Iwamasa and H. Kunitake. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of satsuma. HortScience 25 : 970-972.

Mills, D. and F. A. Hammerschlag. 1994. Isolation of cell and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36 : 99-105.

Miranda, M., T. Motomura, F. Ikeda, T. Ohgawara, W. Saito, T. Endo, M. Omura and T. Muriguchi. 1997. Somatic hybrid obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. Plant Cell Reports 16 : 401-405.

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

Moore, G. A., C. C. Jacano, J. L. Neidigh, S. D. Lawrence and K. Cline. 1993. Transformation in *Citrus*. *In* Biotechnology in Agricultural and Forestry (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 23, pp. 195-208, Heidelberg : Springer – Verlag.

Moriguchi, T., T. Motomura, T. Hikeda, T. Akihama and M. Omura. 1997. Analysis of mitochondrial genomes among *Citrus* plants produced by The interspecific somatic fusion of 'Seminole' tangelo with rough lemon. Plant Cell Reports 16 : 397-400.

Motomura, T., T. Hidaka, T. Moriguchi, T. Akihama and M. Mitsuo. 1995. Intergeneric somatic hybrids between *Citrus* and *Atalantia* or *Severinia* by electrofusion, and recombination of mitochondial genomes. Breeding Science 45 : 309-314.

Motomura, T., T. Moriguchi, T. Akihama, T. Hikada and M. Omura. 1997. Intergeneric Somatic Analysis of Cytoplasmic Genomes in Somatic Hybrids between 'Hazzara' (Abohar) (*Citrus reticulata* Blanco) and *Microcitrus austra* (Planch.) Swingle. J. Japan. Soc. HortScience 65 : 497-503.

Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. First Intern. Citrus Symp. 3 : 1155-1161.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physio. Plant. 5 : 473-497.

Nagamura, Y., S. Kobayashi and I. Nakajima. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyl segments of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). Plant Cell Reports 17 : 435-440.

Nagata, T. and I. Takabe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99 : 12-20.

Niedz, P. R. 1993. Culturing embryogenic protplast of 'Hamlin' sweet orange in calcium alginate beads. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 19-25.

Niu, X., K. Lin, P. M. Hasegawa, R. A. Bressan and S. C. Weller. 1998. Transgenic pepermint (*Mentha X piperita* L.) plants obtained by cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 17 : 165-171.

Norelli, J., J. Mills and H. Aldwinkle. 1996. Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. HortScience 31 : 1026-1027.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara. H. Uchimiya and S. Ishii. 1985. Somatic plant obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor. Appl. Genet. 71 : 1-4.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I Oiyama. 1989. Somatic hybridization in *Citrus*: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). Theor. Appl. Genet. 78 : 609-612.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I Oiyama. 1991. Fertile fruit trees obtained by protoplast fusion : navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* X *P. trifoliata*). Theor. Appl. Genet. 81 : 141-143.

Pena, L., M. Cervaro, J. Juarez, A. Navarro, J. A. Pina and L. Navarro. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Reports 16 : 731-737.

Pena, L. M. Cervera, J. Juarez, C. Ortéga, J. A. Pina, N. Duran-Vita and L. Navaro. 1995a. High effiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. Plant Science 104 : 183-191.

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

Perales, E.H. and O. Schielder. 1993. Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 71-76.

Power, J, B. and M. R. Davey. 1990. Protoplasts of higher and lower plants : Isolation, Culture and Fusion. *In* Methods in Molecular Biology (eds. J. W. Pollard and J. M. Walker) Vol. 6, pp. 237-259 New Jersey : Humana Press.

Power, J. B., E. M. Freason, D. George, P. K. Evans, S. Berry,C. Hayward and E. C. Cooking. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in genus *Petunia*. Plant Science Letters 7 : 51-56.

Reichert, N. A. and D. Liu. 1996. Protoplast isolation, culture, and fusion protocols for kenaf (*Hibiscus cannabinus*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44 : 201-210.

Saito, W., T. Ohgawara, J. Shimizu, S. Ishii and S. Kobayashi. 1993. *Citrus* cybrid regeneration following cell fusion between nucella cells and mesophyll cells. Plant Science 88 : 195-201.

Santarem, E. R., H. N. Trick, J. S. Essig and J. J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons : Optimization of transient expression. Plant Cell Reports 17 : 752-759.

Sriskandarajah, S. and P. Goodwin. 1998. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53 : 1-11.

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

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

Te-chato, S. 1989. Comparision study of isolated protoplast from different sources of yard long bean. Songklanakarin J. Sci. Technol. 10 : 143-147.

Te-chato, S. 1997. Isolation and culture of protoplast of somkhag (*Garcinia atroviridis* Giff.) to microcolony. Songklanakarin J. Sci. Technol. 19 : 255-262.

Theodoropoulos, P. A. and K. A. Roubelakis-Angelakis. 1990. Progress in leaf protoplast isolation and culture from virus-free axenic shoot cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20 : 15-23.

Trick, H. N. and J. J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Reports 17 : 482-488.

Vardi, A., P. Wpiegel-Roy and E. Galun. 1982. Plant regeneration from citrus protoplasts : Variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Appl. Genet. 62 : 171-176.

Vardi, A, S. and E. Galun. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops : *Citrus*. Scientia Horticulturae 37 : 217-230.

Vardi, A, S. Bleichman and D. Aviv. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant Science 69 : 199-206.

White , P. R. 1951. Nutritional requirments for isolated plant tissues and organs. Annu. Rev. Physiol. 2 : 231.

Zhang, J., V. K. Tiwari, T. J. Golds, N. W. Blackhall, E. C. Cocking, B. J. Mulligan, J. B. Power and M. R. Davey. 1995. Parameters influencing transient and stable transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41 : 125-138.

Zhao, K, N., D. J. Bitisnich, G. M. Halloran and M. I. Whitecross. 1995. Studies of cotyledon protoplast cultures from *Brassica napus*, *B. campestris* and *B. oleracea*. I : Cell wall regeneration and cell division. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40 : 59-72.

# ภาคผนวก

**ภาคผนวกที่ 1** องค์ประกอบของอาหารสูตร MS และ MT

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

**ภาคผนวกที่ 1** (ต่อ)

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

**ภาคผนวกที่ 2** องค์ประกอบของสูตรอาหาร YEB สำหรับเลี้ยง *Agrobacterium* สายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121

| 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 |

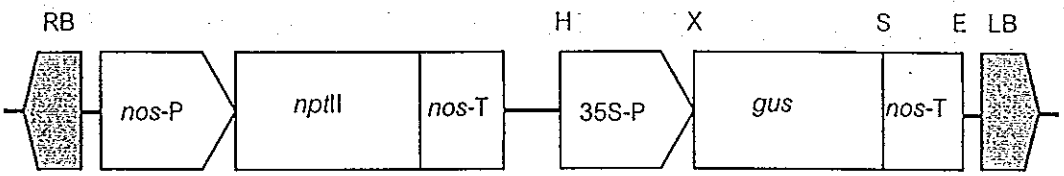
**ภาคผนวกที่ 3** องค์ประกอบของอาหารสูตร AB สำหรับเลี้ยง *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| $K_2PO_4$ | 3,000 |
| $NaH_2PO_4$ | 1,000 |
| $NH_4Cl$ | 1,000 |
| $MgSO_47H_2O$ | 300 |
| KCl | 150 |
| $CaCl_2$ | 10 |
| $FeSO_47H_2O$ | 2.5 |
| Glucose | 5.0 |
| Agar | 1,500 |

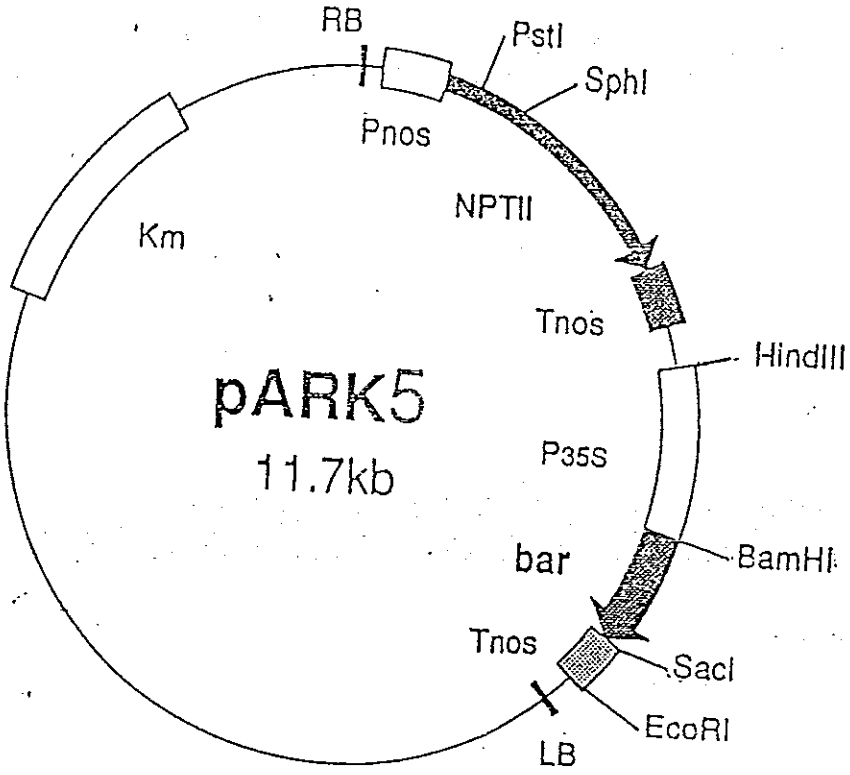
**ภาคผนวกที่ 4** องค์ประกอบของอาหารสูตร LB สำหรับเลี้ยง *Agrobacterium* สายเชื้อ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121 และสายเชื้อ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pARK5

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| Tryptone | 10,000 |
| Yeast extract | 5,000 |
| NaCl | 10,000 |
| Agar | 1,500.00 |

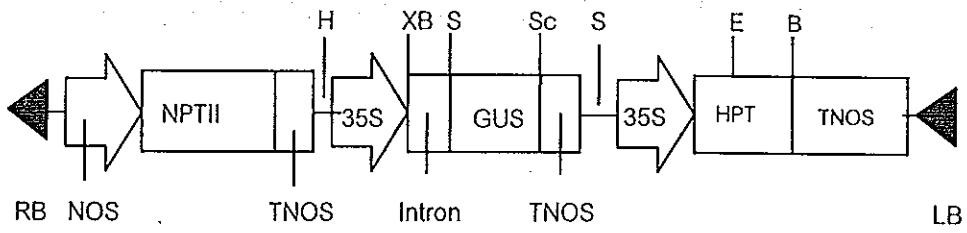
ภาคผนวกที่ 5 โครงสร้างของพลาสมิด pBI121




ภาคผนวกที่ 6 โครงสร้างของพลาสมิด pARK5



**ภาคผนวกที่ 7** โครงสร้างของพลาสมิด pIG121



# ประวัติผู้เขียน

**ชื่อ** นางสาวโสภา ทวีคณะโชติ

**วัน เดือน ปี เกิด** 3 มีนาคม 2515

**วุฒิการศึกษา**

| วุฒิ | ชื่อสถาบัน | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
|---|---|---|
| วิทยาศาสตรบัณฑิต | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | 2537 |

**ทุนการศึกษาที่ได้รับ**

- ทุนสนับสนุนจากโครงการทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีการศึกษา 2539-2540
- ทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในสถาบันราชภัฏ ประจำปีการศึกษา 2541