ORIGINAL ARTICLE

ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนให้กับมังคุด

สมปอง เตชะโต[1] และ วิทูล ไชยภักดี[2]

Abstract

Te-chato, S. and Chaipakdee, V.

Factors affecting gene transformation in mangosteen

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003, 25(4) : 435-449

Factors affecting gene transformation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) were investigated. Types of explants, strains and densities of *Agrobacterium tumefaciens*, and co-culture methods were examined to optimize gene transformation. The results showed that among strains of *Agrobacterium tumefaciens* tested, LBA 4404 containing pBI 121 gave the calli with the highest resistance to kanamycin. Kanamycin at the concentration of 50-100 mg/l was the best range for selection of transformants. Higher density of agrobacteria tended to promote higher frequency of transformation. The best co-culture method was dipping the explant in a solution of agrobacteria for 10 minutes, followed by culturing onto co-culture medium without antibiotic for 48 hours. Among the explants used to co-culture with bacteria, half leaf treatment gave the best result for transformation; however, callus proliferation and plantlet regeneration were inferior to whole leaf treatment. Activity of β-Glucuronidase (GUS) could not be detected, thus resistance to kanamycin was used for detecting transformability. Shoot primordia could be induced from kanamycin-resistant calli grown in regeneration medium. After maintenance by subculturing to the same medium 2 to 3 times in 2-3 months, the developed shoots turned brown and finally died. Hence, the transformed plant of mangosteen was not obtained from this experiment.

Key words : mangosteen, gene transformation, kanamycin, β-Glucuronidase

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand

[1]Ph.D.(Plant Cell Technology), รองศาสตราจารย์, [2]วท.ม.(พืชศาสตร์), ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: tesompon@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 2 เมษายน 2546 รับลงพิมพ์ 28 พฤษภาคม 2546

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต และ วิทูล ไชยภักดี

ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนให้กับมังคุด

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2546 25(4) : 435-449

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนในมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ขั้นต้นเป็นการศึกษาผลของการสร้างแผลให้กับแผ่นใบ ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของมังคุด สายเชื้อและความหนาแน่นของอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) และวิธีการเลี้ยงร่วมเพื่อความเหมาะสมในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อต่าง ๆ ของอะโกรแบคทีเรียที่ทดสอบ พบว่า สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121 ให้แคลลัสที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินสูงที่สุด คานามัยซินเข้มข้น 50-100 มก/ล มีความเหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการปลูกถ่ายยีน การเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อสูงขึ้นทำให้ความสามารถในการปลูกถ่ายยีนสูงขึ้น สำหรับวิธีการเลี้ยงร่วมนั้น พบว่า การจุ่มชิ้นส่วนพืชในสารละลายอะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใช้เลี้ยงร่วมซึ่งปราศจากสารปฏิชีวนะอีก 48 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุด ชิ้นส่วนที่เลี้ยงร่วมแล้วให้ผลการปลูกถ่ายยีนได้ดีที่สุดคือ แผ่นใบที่ตัดแบ่งเป็นสองส่วน แต่ความสามารถในการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ต่ำกว่าชิ้นส่วนแผ่นใบทั้งใบ ตายอดขนาดเล็กได้รับการชักนำจากแคลลัสที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนบนอาหารชักนำการสร้างพืชต้นใหม่ หลังจากย้ายเลี้ยงไปในอาหารใหม่สูตรเดิม 2-3 ครั้ง ในเวลา 2-3 เดือน มีความต้านทานต่อคานามัยซินได้ แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์กลูเคอโรนิเดส (GUS) อย่างไรก็ตาม ตายอดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่ได้ต้นมังคุดจำลองพันธุ์

การปลูกถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัย T-DNA สามารถที่จะแฝงยีนที่ต้องการไปกับ T-DNA โดยการตัดยีนที่ไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่าย T-DNA บน Ti plasmid หรือยีนอื่นๆ บน T-DNA ออก แล้วแทนที่ด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อมีการปลูกถ่าย T-DNA เข้าสู่พืชโดยอะโกรแบคทีเรีย พืชก็จะได้รับยีนที่ตัดต่อไว้แทน ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการ ปัจจุบันมีรายงานผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียในไม้ผล และไม้ยืนต้นหลายชนิด (McAfee *et al*., 1993; Norelli *et al*., 1994; Stephen *et al*., 1994; Pena *et al*., 1995b; Mondal *et al*., 2001; Charity *et al*., 2002) สำหรับไม้ผลนั้น ส่วนใหญ่เป็นพืชเมืองหนาวหรือเขตอบอุ่น ที่มีการวิจัยพื้นฐานอย่างดีเกี่ยวกับความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ไม่ว่าโดยกระบวนการออกาโนเจนิซิสหรือเอ็มบริโอเจนิซิส เช่น ในแอปเปิ้ล (Jullian *et al*., 2002; Maddumage, *et al*., 2002) และส้ม (Deng, 2002) เป็นต้น ยีนที่ใช้ปลูกถ่ายนั้น เป็นยีนที่มีความสำคัญทางพืชไร่หรือพืชสวน เช่น ยีนที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ในแอบเปิ้ล (Norelli *et al*., 1994) ยีนที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืชบาสตา หรือฟอสฟิโนตริซิน (Deng, 2002) ยีนโปรโมเตอร์ที่ใช้อ่านยีนที่ต้องการโดยทั่วไปใช้ 35S จาก CaMV ยีนรายงานผลอื่นๆ เช่น ยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะคานามัยซินและ/หรือไฮโกรมัยซิน ยีน *gus* และยีนที่หยุดอ่านรหัสข้อมูล Lowe และคณะ (1993) รายงานถึงปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการปลูกถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียว่า สายเชื้อและชิ้นส่วนที่ใช้ปลูกถ่ายมีผลต่อการปลูกถ่ายยีนกับเบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora*) พันธุ์ Super White ชิ้นส่วนลำต้นที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ C58#3 ที่มีพลาสมิด pFW220, สายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pCG20 ซึ่งมียีนที่ต้านทานต่อคานามัยซิน (สารปฏิชีวนะสำหรับคัดเลือก) และพลาสมิด pJIT101, pJIT119 มียีนที่ต้านทานต่อบาสตา (Basta) และ อะซูล็อกซ์ (Asulox) (สารกำจัดวัชพืชสำหรับคัดเลือก) ให้การสร้างแคลลัสได้ต่างกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ยีนเครื่องหมายข้างต้นไม่สามารถใช้เป็นตัวชี้ในการปลูกถ่ายยีน และจากการศึกษาข้างต้นไม่สามารถทำการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่เบญจมาศได้ นอกจากนี้ การใช้สารประกอบฟีโนลบางตัว เช่น อะซีโตไซริงกอน (Stephen *et al*., 1994) และความหนาแน่น

ของเชื้อที่เหมาะสมก็ส่งผลต่อความสำเร็จดังกล่าว (Pena *et al*., 1995b) สำหรับในมังคุดซึ่งเป็นไม้ผลเมืองร้อนซึ่งมีอัตราการสร้างยางสูงนั้นยังไม่มีรายงานการปลูกถ่ายยีนมาก่อนเลย

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาหาปัจจัยพื้นฐานที่จำเป็นต่อกระบวนการปลูกถ่ายยีน เช่น สายเชื้อ *Agrobacterium* ความหนาแน่น เทคนิคการปลูกถ่ายยีนให้กับแคลลัส และใบอ่อนมังคุดที่มีความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูงเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญโดยเฉพาะยีนที่ทนแล้งให้กับมังคุดต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ใช้ใบอ่อนสีแดงมังคุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในหลอดทดลอง ตามขั้นตอนที่รายงานโดย Te-chato and Lim (2000) ขั้นตอนโดยย่อคือ ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล และเจลไรท์ 0.15% เพิ่มปริมาณแคลลัสในสูตรอาหารเดียวกัน ต่อมาชักนำยอดในอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 0.1 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล และเจลไรท์ 0.25% และชักนำการยืดยาวยอดโดยการเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง ($^1/_2$ MS) เติม BA 0.03 มก/ล NAA 0.06 มก/ล ลงไปบนอาหารชักนำยอดหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ จากนั้นตัดใบอ่อนที่มีอายุ 10-15 วัน มาทำการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียเพื่อศึกษาการปลูกถ่ายยีน

เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Agrobacterium tumefaciens ที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 สายเชื้อ คือ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 ที่ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อคานามัยซิน และ *gus* β-Glucuronidase) เป็นยีนรายงานผล พลาสมิด pTok 233 ที่ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน และ *gus* เป็นยีนรายงานผล อีกสายเชื้อเป็นพันธุ์ป่า (wild type) คือ A13 ประกอบด้วยยีนโอไพน์ และสายเชื้อเดียวกันที่มีพลาสมิด pBI 121 มียีนเครื่องหมายที่ต้านทานต่อคานามัยซิน และ *gus* เป็นยีนรายงานผล

อาหารและวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษามีอยู่หลายสูตร สามารถแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมังคุด

1.1 สูตรอาหารชักนำยอดรวมจากเมล็ด เป็นอาหารดัดแปลงสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% ผงวุ้นตรานางเงือก 0.7% PVP 500 มก/ล และ BA 5 มก/ล

1.2 สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากใบอ่อน เป็นอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน MS เติม BA 0.5 มก/ล TDZ 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล และเจลไรท์ 0.15%

1.3 สูตรอาหารชักนำจุดกำเนิดตายอด เป็นอาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล และเจลไรท์ 0.25%

1.4 สูตรอาหารชักนำการยืดยาวของยอด เป็นอาหารเหลวสูตร MS ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ เติม BA 0.03 มก/ล NAA 0.06 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% และ PVP 500 มก/ล

1.5 สูตรอาหารแข็งชักนำยอดโดยตรงจากใบ เป็นอาหารแข็งสูตร WPM เติม BA 5 มก/ล ปราศจากซีโฟทาซิมหรือเติมระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 50, 100, 200 และ 400 มก/ล

2. อาหารเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

อาหารสูตร yeast extract broth (YEB) เติมคานามัยซิน 50 มก/ล ใช้เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI 121, *A. rhizogenes* สายเชื้อ A13 ที่มีพลาสมิด pBI 121 และไม่เติมคานามัยซิน ใช้เลี้ยง *A. rhizogenes* สายเชื้อ A13 พันธุ์ป่า

อาหารสูตร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มก/ล ใช้เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233

3. อาหารที่ใช้เลี้ยงใบมังคุดหลังมีการปลูกถ่ายยีน

3.1 สูตรอาหารกำจัดเชื้อ เป็นอาหารสูตร 1.2 (อาหารชักนำแคลลัส) เติมซีโฟทาซิม 50-400 มก/ล

3.2 สูตรอาหารชักนำแคลลัสเพื่อคัดเลือกการ

ปลูกถ่ายยีน เป็นอาหารสูตร 1.2 เติมคานามัยซิน 50 ถึง 250 มก/ล หรือไฮโกรมัยซิน 20 มก/ล

3.3 สูตรอาหารชักนำยอดเพื่อคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนเป็นอาหารสูตร 1.3 (อาหารชักนำจุดกำเนิดตายอด) เติมคานามัยซิน 50 มก/ล หรือไฮโกรมัยซิน 20 มก/ล

อาหารทุกสูตรปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 1.1 กก/ตร.ซม. เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นสารปฏิชีวนะฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 22 ไมครอน หลังจากนั้นเติมลงในอาหารที่กำลังอุ่นที่อุณหภูมิ 40-45ºC

การเตรียมอะโกรแบคทีเรีย

ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 มีพลาสมิด pBI 121 และ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว YEB เติมคานามัยซิน 50 มก/ล ซึ่งบรรจุในฟลาสค์ขนาด 125 มล. ปริมาตร 40 มล. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่อินคิวเบทเป็นเวลาต่างๆ ปรับให้มีความหนาแน่น 1.98×10^{10}, 9.9×10^{9} และ 4.9×10^{9} เซลล์/มล. เลี้ยงร่วมกับใบเพื่อศึกษาการปลูกถ่ายยีนต่อไป

สำหรับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 ใช้จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มก/ล ซึ่งบรรจุในฟลาสค์ขนาด 125 มล. ปริมาตร 40 มล. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้เลี้ยงร่วมกับใบเพื่อศึกษาการปลูกถ่ายยีนต่อไป

การเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับแผ่นใบและชิ้นส่วนของต้นอ่อนมังคุด

ใช้ใบมีดผ่าตัดตัดใบอ่อนสีแดงอายุ 10-15 วัน และชิ้นส่วนของต้นอ่อนมังคุดจากต้นที่เลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียที่ผ่านการอินคิวเบทเป็นเวลาต่างๆ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 3.1 (อาหารชักนำแคลลัสและกำจัดเชื้อ) เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม 200 มก/ล เพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรีย จากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดเลือกสูตร 3.2 (อาหารชักนำแคลลัส และคัดเลือกหลังการปลูกถ่ายยีน) ทำการย้ายเลี้ยงทุกเดือนบนอาหารเดิม หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 จึงย้ายไปชักนำยอดบนอาหารสูตร 3.3 (อาหารชักนำจุดกำเนิดตายอดและคัดเลือกหลังปลูกถ่ายยีน) ที่เติมสารปฏิชีวนะคานามัยซินหรือไฮโกรมัยซิน

การตรวจสอบกิจกรรมของ GUS

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

การศึกษาผลของสายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

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

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอด ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาจุ่มแช่เชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหารเหลวเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำมาเพาะเลี้ยงชักนำการสร้างแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม 200 มก/ล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

ที่เติมคานามัยซิน 50 มก/ล (สูตรที่ 3.2) (ยกเว้น *Agrobacterium rhizogenes* พันธุ์ป่า สายเชื้อ A13 เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมไม่เติมสารปฏิชีวนะภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชม/วัน อุณหภูมิ 26±2ºC หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและเวลาโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมี และการต้านทานต่อคานามัยซิน วางสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

การศึกษาผลของสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ได้ทดสอบปัจจัย 2 ปัจจัย คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรียและความหนาแน่น แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 เชื้อสาย คือ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok 233 และเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A13 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 แต่ละสายเชื้อใช้ความหนาแน่น 3 ระดับ คือ ความหนาแน่น 4.95×10^9 9.9×10^9 และ 1.98×10^{10} เซลล์/มล.

ตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอดซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาเลี้ยงร่วมกับเชื้อทั้ง 3 สายเชื้อ ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อทั้ง 3 ระดับ ในอาหารเหลวสูตร 1.2 บนเครื่องเขย่า 60 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1.2 เติมซีโฟทาซิม 200 มก/ล สำหรับสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTok 233 อินคิวเบทด้วยอาหาร AB เติมไฮโกรมัยซิน 20 มก/ล แทนคานามัยซิน หลังจากเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายใบไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน 50 มก/ล (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชม/วัน อุณหภูมิ 26±2ºC หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ *gus* และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร คัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและความหนาแน่นโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน วางสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

การศึกษาวิธีการและเวลาเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

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

1. เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก จึงกำจัดเชื้อ
2. เลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อ
3. เลี้ยงร่วมโดยใช้อัลตราโซนิค 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อและ
4. การจุ่มแช่แล้วยกทันที จากนั้นปักเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 ต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงกำจัดเชื้อหลังจากซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก และเพาะเลี้ยงตามวิธีการทั้ง 4 วิธี จึงกำจัดเชื้อโดยย้ายใบไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.2 เติมซีโฟทาซิม 200 มก/ล (สูตรที่ 3.1) เวลา 48 ชั่วโมง จึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มก/ล (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชม/วัน อุณหภูมิ 26±2ºC หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกผลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ *gus* และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม

เดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนแต่ละวิธีการเลี้ยงร่วมโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

ศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

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

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงจากยอดมังคุดซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น และสร้างแผลให้กับแผ่นใบทั้ง 4 แบบ นำไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 ที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหารเหลว 48 ชั่วโมง โดยใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาที และไม่ใช้อัลตราโซนิค ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำมาเพาะเลี้ยงชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเลี้ยงไปบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม 200 มก/ล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มก/ล (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชม/วัน อุณหภูมิ 26±2ºC หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกข้อมูลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างวิธีการสร้างแผลให้กับแผ่นใบเมื่อใช้และไม่ใช้อัลตราโซนิคโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน วางสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

การศึกษาผลของสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ในการศึกษานี้ทดสอบ 2 ปัจจัย คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และชิ้นส่วนของมังคุด แต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ ดังนี้คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายเชื้อ คือ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI 121 และเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTok 233 ส่วนชิ้นส่วนที่ใช้คือ ใบอ่อนสีแดงและส่วนของลำต้น

ทำการตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบและส่วนของลำต้นจากยอดมังคุดซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น มาจุ่มแช่เชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการอินคิวเบทในอาหารเหลวตามวิธีการข้างต้นเป็นเวลา 10 นาที ซับอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนใบและลำต้นมาเพาะเลี้ยงชักนำการสร้างแคลลัสบนอาหารสูตร 1.2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเลี้ยงไปบนอาหารสูตรเดิมเติมซีโฟทาซิม 200 มก/ล เวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 50 มก/ล (สูตรที่ 3.2) ภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชม/วัน อุณหภูมิ 26±2ºC หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกข้อมูลการสร้างแคลลัส ตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเดือนละครั้งเป็นเวลา 2 เดือน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ตรวจสอบความสามารถในการปลูกถ่ายยีนระหว่างสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อเคมีและการต้านทานต่อคานามัยซิน วางสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละหน่วยการทดลองย่อยทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 25 ใบ

ผลการทดลอง

การศึกษาผลของสายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาการใช้สายเชื้อ 3 สายเชื้อ และเวลาในการอินคิวเบทต่างกัน 3 เวลา พบว่าใบเริ่มมีการสร้างแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 19 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าใบที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียทั้ง 2 สายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่างกันสามารถสร้างแคลลัสได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสายเชื้อ LBA 4404 ที่มี่ pBI 221 มีแนวโน้มให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีน

Table 1. Analyses of strains of *Agrobacterium* and incubation periods for transformability and callus formation.

	Incubation period (h)				
Strains	**24**	**36**	**48**	**Avg**	**F-test**
1st Subculture					
Without co-culture	30	30	30	30	
A13 (WT)	39	48	30	39	
A13 pBI (221)	46	17	55	39.33	
LBA 4404 (pBI 221)	40	49	52	48.33	
Avg	38.75	36	42.75		ns
F-test				ns	
C.V. (%)					48.34
2nd Subculture					
Without co-culture	20	20	20	20	
A13 (WT)	33	30	29	30.67	
A13 (pBI 221)	26	17	34	25.67	
LBA 4404 (pBI 221)	35	33	40	38.33	
Avg.	28.5	25	32.5		ns
F-test				ns	
C.V.(%)					46.19
3rd Subculture					
Without co-culture	3	3	3	3	
A13 (WT)	25	39	25	29.55	
A13 (pBI 221)	0	4	3	2.33	
LBA 4404 (pBI 221)	0	3	6	3	
Avg.	7	12.25	9.25		
4th Subculture					
Without co-culture	0	0	0	0	
A13 (WT)	25	39	25	29.55	
A13 (pBI 221)	0	0	0	0	
LBA (4404 pBI) 221221 221	0	0	2	0.66	
Avg.	6.25	9.75	6.75		

ns = not significantly different
Statistical analysis was not performed after 2nd subculture

48.33 และ 38.33% ในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ สูงกว่าสายเชื้ออื่นๆ ส่วนเวลาในการอินคิวเบทนั้นพบว่า เวลาที่มีแนวโน้มในการให้แคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนสูงสุดคือ การอินคิวเบทที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้การสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินเฉลี่ย 42.75 และ 32.5% ในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Table 1) ส่วนสายเชื้อ A13 พันธุ์ป่า ให้แคลลัสที่พัฒนาตามปกติไม่มีการตายเกิดขึ้น สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ไม่แตกต่างกับแคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อ และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมคานามัยซิน หลังจากการย้ายแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำยอดและคัดเลือกการปลูกถ่ายยีน พบว่าได้แคลลัสพัฒนาไปเป็นกลุ่มตารวมที่ต้านทานต่อคานามัยซินเพียง 2% เฉพาะสายเชื้อ LBA 4404 pBI 221 แต่หลังจากย้ายเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือน พบว่ากลุ่มตารวมดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาการต่อไปเป็นต้นได้เปลี่ยนเป็นสีดำและตาย ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ กลุ่มตารวมสามารถพัฒนาไปเป็นยอดรวมและต้นได้ จากการสุ่มแคลลัสรอดชีวิตหลังการปลูกถ่ายยีนเป็นเวลา 1 เดือน จำนวน 10% เพื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อเคมีไม่พบกิจกรรมของ GUS

การศึกษาผลของสายเชื้อและความหนาแน่นเชื้อต่อการปลูกถ่ายยีน

ผลการศึกษาสายเชื้อ 3 สายเชื้อ และความหนาแน่นเชื้อ 3 ระดับ ต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน พบว่าเริ่มมีการสร้างแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 19 วัน สายเชื้อที่ให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนสูงที่สุดคือ A13 (pBI 221) ซึ่งให้แคลลัสต้านทานต่อคานา-มัยซินเฉลี่ย 39.67% และ 18.66% หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับสายเชื้ออื่นและหน่วยทดลองเปรียบเทียบ รองลงมาคือสายเชื้อ LBA 4404 (pBI 221) ให้แคลลัสที่มีความต้านทานได้ 29 และ 15.67% ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนระดับความหนาแน่นของเชื้อที่ให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้สูงสุดคือ 1.9×10^{10} ซึ่งให้การสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินเฉลี่ย 35.75 และ 19% หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง กับที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 9.9×10^{9} ซึ่งสร้างแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินได้ 22.5 และ 12.25% หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 4.9×10^{9} สร้างแคลลัสได้ 21.75 และ 13.5% หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Table 2) หลังจากย้ายไปเลี้ยงยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดคัดเลือกการปลูกถ่ายยีนพบว่าการใช้สายเชื้อ A13 (pBI 221) ให้แคลลัสรอดชีวิต 1.33% สายเชื้อ LBA 4404 pBI 221 และ LBA 4404 pTok 233 ให้แคลลัสรอดชีวิต 0.66 และ 0.33% ตามลำดับ ส่วนระดับความหนาแน่นที่ให้การรอดชีวิตของแคลลัสสูงสุดคือที่ระดับความหนาแน่น 1.9×10^{10} ซึ่งให้แคลลัส รอดชีวิตได้ 0.75% แต่แคลลัสดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาเป็นกลุ่มตารวมหรือยอดได้ และเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด ในขณะที่แคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมและเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่เติมคานามัยซินสามารถพัฒนาไปเป็นกลุ่มตารวมและยอดได้ จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 2 พบว่าการใช้ระดับความหนาแน่นเชื้อสูงขึ้นส่งเสริมให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินและการรอดชีวิตของแคลลัสสูงขึ้น สายเชื้อที่ให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงสุดคือ A13 (pBI 221) 56% รองลงมาคือ สายเชื้อ LBA 4404 (pBI 221) 45% ที่ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 1.9×10^{10} เซลล์/มล. ส่วนสายเชื้อ LBA 4404 (pTok 233) ให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินต่ำสุด 13% ที่ระดับความหนาแน่น 4.9×10^{9} เซลล์/มล. ส่วนความหนาแน่นที่ 9.9×10^{9} เซลล์/มล. มีผลทำให้การสร้างแคลลัส LBA 4404 pBI 221 ลดลงแต่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ระดับความหนาแน่นสูงขึ้นเป็น 1.9×10^{10} เซลล์/มล. (Table 2)

การศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วมต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

จากการศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วมแตกต่างกัน 4 วิธี และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าใบสามารถสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ให้การสร้างแคลลัสได้สูงกว่าคือ 67% รองลงมาคือการเลี้ยงด้วยวิธีจุ่มเชื้อปักเลี้ยง สร้างแคลลัสได้ 60% แต่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน พบว่าแคลลัสที่ได้จากการ

Table 2. Effect of bacterial strain and density on gene transformation detected by resistance to kanamycin.

	Density (cell/ml)				
Strain of *Agrobacterium*	**4.9×10^9**	**9.9×10^9**	**1.9×10^{10}**	**Avg.**	**F-test**
1st Subculture					
Without co-culture	18	18	18	18 c	
A13 (pBI 221)	31	32	56	39.67 a	
LBA 4404 (pBI 221)	25	17	45	29 b	
LBA 4404 (pTok 233)	13	23	24	20 bc	
Avg.	21.75 b	22.5 b	35.75 a		**
F-test				**	
C.V. (%)					34.05
2nd Subculture					
Without co-culture	14	14	14	14	
A13 (pBI 221)	15	12	29	18.66	
LBA 4404 (pBI 221)	15	14	18	15.67	
LBA 4404 (pTok 233)	10	9	18	12.33	
Avg.	13.5 b	12.25 b	19 a		**
F-test				ns	
C.V. (%)					47.70
3rd Subculture					
Without co-culture	1	1	1	1	
A13 (pBI 221)	2	3	5	3.33	
LBA (4404 pBI 221)	2	2	4	2.66	
LBA 4404 (pTok 233)	2	0	2	1.33	
Avg.	1.75	1.5	3		
4th Subculture					
Without co-culture	0	0	0	0	
A13 (pBI 221)	1	1	2	1.33	
LBA 4404 (pBI 221)	1	1	0	0.66	
LBA 4404 (pTok 233)	0	0	1	0.33	
Avg.	0.5	0.5	0.75		

**** Significantly different at P<0.01**
Means not sharing common letter within rows or columns differ significantly by DMRT
Statistical analysis was not performed after 2nd subculture

เพาะเลี้ยงใบร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย 10 นาทีและเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร 48 ชั่วโมง ต้านทานต่อคานามัยซินสูงสุด 21% รองลงมาคือการเลี้ยงร่วมด้วยวิธีการจุ่มเชื้อปักเลี้ยงและการเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 10 นาที ให้แคลลัสรอดชีวิต 19 และ 18% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัลตราโซนิค ซึ่งแคลลัสรอดชีวิตได้ 15% หลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 (เดือนที่ 3) เหลือแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินลดลง การย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและคัดเลือก พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย

10 นาทีและเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร 48 ชั่วโมง มีแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเพียงการทดลองเดียวเท่านั้น (1%) ส่วนการทดลองอื่นๆ ไม่มีแคลลัสรอดชีวิต จึงพอสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงใบร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย 10 นาทีและเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนสูงกว่าวิธีการอื่น (Table 3)

การศึกษาวิธีการสร้างแผลกับแผ่นใบต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ผลการสร้างแผลกับแผ่นใบแบบต่างๆ และการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 วินาที ต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีนเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ พบว่าการไม่ใช้และการใช้อัลตราโซนิค ส่งเสริมการสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบความสามารถดังกล่าวหลังเลี้ยงแคลลัสในอาหารเติมคานามัยซินเป็นเวลา 1 และ 2 เดือน พบว่าหน่วยทดลองที่ไม่ใช้อัลตราโซนิคให้การสร้างแคลลัส 69.25 และ 32.75% ในขณะที่การใช้อัลตราโซนิคให้การสร้างแคลลัส 59.50 และ 30.5% (Table 4) ส่วนการสร้างแผลกับแผ่นใบทั้ง 4 แบบ พบว่าการตัดใบเป็น 2 ส่วนให้การสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้สูงสุด 85.5% แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเลี้ยงทั้งใบ กรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-2 รอย ซึ่งให้การสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 70, 58.7 และ 43.5% ตามลำดับ (Table 4) ถึงแม้การใช้และการไม่ใช้อัลตราโซนิคให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินไม่แตกต่างกัน ใบที่ใช้อัลตราโซนิคมีลักษณะไหม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากกว่า และตายเร็วกว่าใบที่ไม่ใช้อัลตราโซนิค หลังจากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 พบว่าการตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวาง และการเลี้ยงทั้งใบ ให้การรอดชีวิตของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมคานามัยซิน 41 และ 39% ตามลำดับ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการกรีดแผ่นใบโดยการตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-2 รอย ซึ่งให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 25 และ 21.5% ตามลำดับ หลังจากการย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำการสร้างยอดและคัดเลือก พบว่ามีการรอดชีวิตของแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินของใบที่เลี้ยงทั้งใบ และการตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวางร่วมกับวิธีการเลี้ยงร่วมโดยไม่ใช้อัลตราโซนิคเท่านั้น ซึ่งให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 2 และ 1% ตามลำดับ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 2

การศึกษาผลของสายเชื้อและชิ้นส่วนมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน

ผลการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบและส่วนของลำต้นอ่อนเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายเชื้อต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเมื่อตรวจสอบผลทั้ง 2 ปัจจัย มีการสร้างแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินไม่แตกต่างกันทางสถิติ

Table 3. Effect of co-culture techniques on gene transformation detected by resistance to kanamycin.

Technique of co-culture	Callus formation (%)			
	1st Subculture	2nd Subculture	3rd Subculture	4th Subculture
Soaking for 10 min	67	18 a	3	0
Soaking for 10 min and culture in medium for 48 h	55	21 a	5	1
Soaking and sonicating for 10 min	58	15 b	1	0
Dipping and inserting in culture medium	60	19 a	2	0
F-test	ns	*		
C.V. (%)	23.52	17.52		

ns = not significant difference
*** Significant difference (P<0.05)**
Means not sharing common letter within column differ significantly by DMRT
Statistical analysis was not performed after 2nd subculture

Table 4. Effect of wounding formation to the leaf explants and co-culture technique on callus formation and gene transformation.

Strain of *Agrobacterium*	Wounding formation					
	Whole leaf	Cut to half	1 Notching	2 Notching	Avg.	F-test
1st Subculture						
Without sonicator	78	93	60	46	69.25	
With sonicator	62	78	57	41	59.50	
Avg.	70.00 b	85.50 a	58.70 b	43.50 b		**
F-test					ns	
C.V. (%)						16.53
2nd Subculture						
Without sonicator	39	43	26	23	32.75	
With sonicator	39	39	24	20	30.50	
Avg.	39.00 a	41.00 a	25.00 b	21.50 b		**
F-test					ns	
C.V. (%)						16.40
3th Subculture						
Without sonicator	10	7	7	3	6.75	
With sonicator	3	3	2	2	2.50	
Avg.	6.50	5.00	4.50	2.50		
4th Subculture						
Without sonicator	2	1	0	0		
With sonicator	0	0	0	0		
Avg.	1.00	0.50	0	0		

ns not significant difference
**** Significant difference (P<0.01)**
Means not sharing common letter within rows or columns differ significantly by DMRT
Statistical analysis was not performed after 2nd subculture

อย่างไรก็ตามใบสีแดงให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 59% และ 24.5% ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 มีแนวโน้มดีกว่าการใช้ส่วนของลำต้นซึ่งให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซิน 49% และ 18.5% การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ สำหรับสายเชื้อ LBA 4404 pBI 221 ให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานมัยซิน 54 และ 22.5% ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนสายเชื้อ LBA 4404 pTok 233 ให้แคลลัส 54 และ 20.5% ของการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Table 5) หลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 การรอดชีวิตของแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ และตายในที่สุด ไม่พบแคลลัสต้านทานต่อคานามัยซิน

วิจารณ์

ปัจจัยที่มีผลสำเร็จต่อการปลูกถ่ายยีนนั้นมีจำนวนมาก ปัจจัยพื้นฐานที่นับว่าสำคัญและจำเป็นต้องคำนึงถึงได้แก่ สายเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งรวมถึงโครงสร้างของพลาสมิดที่ได้ตัดต่อไว้ด้วย ชนิดและชิ้นส่วนพืชที่นำมาปลูกถ่าย และเทคนิคที่ใช้หรือนำมาประยุกต์ใช้รวมถึงระยะ

Table 5. Effect of strain of *Agrobacterium* and explant type on callus formation and gene transformation.

	Explant type			
Strain of *Agrobacterium*	**Red leaf**	**Stem**	**Avg.**	**F- test**
1st Subculture				
LBA 4404 (pBI 221)	58	50	54.00	
LBA 4404 (pTok 233)	60	48	54.00	
Avg.	59.00	49.00		ns
F-test			ns	
C.V. (%)				20.95
2nd Subculture				
LBA 4404 (pBI 221)	25	20	22.50	
LBA 4404 (pTok 233)	24	17	20.50	
Avg.	24.50	18.50		ns
F-test			ns	
C.V. (%)				19.73
3rd Subculture				
LBA 4404 (pBI 221)	3	2	2.50	
LBA 4404 (pTok 233)	2	0	1.00	
Avg.	2.50	1.00		
4th Subculture				
LBA 4404 (pBI 221)	0	0	0	
LBA 4404 (pTok 233)	0	0	0	
Avg.	0	0		

ns = not significantly different
Statistical analysis was not performed after 2nd subculture

เวลาในการอินคิวเบท Jong และคณะ (1993) พบว่าการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด p35GUSINT ที่มีความรุนแรงสามารถปลูกถ่ายยีนได้สูง McAfee และคณะ (1993) ศึกษาการชักนำรากใน pine (*Pinus*) larch (*Larix*) โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ A4 และ R1000 พบว่าสายเชื้อ A4 สามารถปลูกถ่ายยีนได้ดีกว่าสายเชื้อ R1000 ต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนมีการสร้างรากและคุณภาพของรากดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายยีน Lowe และคณะ (1993) ได้ศึกษาปัจจัยบางประการต่อการปลูกถ่ายยีนและการเจริญเป็นต้นใหม่ของเบญจมาศ พบว่าสายเชื้อทั้ง 17 สายเชื้อมีผลต่อการสร้างแคลลัสของใบ นอกจากชนิดของเชื้อแล้วความหนาแน่นก็มีผลเช่นเดียวกัน Lin และคณะ (1994) ที่ทำการทดลองการปลูกถ่ายยีนในยาสูบและ *Arabidopsis thalina* พบว่า การใช้ระดับความหนาแน่นของเชื้อสูงขึ้นทำให้ความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนสูงขึ้น ในขณะที่ Pena และคณะ (1995ก,ข) พบว่าปลูกถ่ายยีนให้ประสิทธิภาพสูงในส้มโดยใช้สายเชื้อที่มีความรุนแรงและความหนาแน่นของเชื้อ 4×10^7 เซลล์/มล. ส่วนความหนาแน่น 4×10^8 เซลล์/มล. ประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ต่ำกว่า เห็นได้ชัดเจนว่าการใช้ระดับความหนาแน่นที่ใช้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายเชื้อและชนิดของพืช ส่วนการ

ทดลองของ Jong และคณะ (1993) พบว่าการปลูกถ่ายยีนในเบญจมาศด้วย *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด p35GUSINT ระดับความหนาแน่นของเชื้อ 5×10^8 เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ในการปลูกถ่ายยีนมากที่สุด

ในการศึกษานี้ พบว่าอะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายเชื้อและเวลาในการอินคิวเบทต่างกัน ให้การสร้างแคลลัสได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม สายเชื้อ LBA 4404 ที่มี pBI 221 มีแนวโน้มให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่าหน่วยทดลองอื่น ระดับความหนาแน่นที่ให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินสูงที่สุดคือ 1.9×10^{10} เซลล์/มล. แม้ว่าที่ระดับความหนาแน่น 9.9×10^9 เซลล์/มล. ของสายเชื้อ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI221 ให้แคลลัสน้อยในช่วงแรกก็ตาม แต่หลังจากย้ายเลี้ยงต่อมาจำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเป็นไปในทำนองเดียวกันกับทุกระดับความหนาแน่น แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เมื่อย้ายเลี้ยงไปยังอาหารสูตร 3.3 เพื่อชักนำยอดและคัดเลือก 1 เดือน แคลลัสดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาไปเป็นกลุ่มตารวมหรือยอดได้ แต่เปลี่ยนเป็นสีดำและตาย Lowe และคณะ (1993) รายงานการใช้แคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบร่วมกับเชื้อทั้ง 17 สายเชื้อ ว่าไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการปลูกถ่ายยีนได้ เนื่องจากยังไม่ได้ต้นที่สมบูรณ์และยังไม่พบกิจกรรมของ GUS ได้เพียงแคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินเท่านั้น เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่ไม่สามารถที่จะตรวจสอบกิจกรรมของ GUS และไม่สามารถชักนำต้นที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้

เวลาในการอินคิวเบทที่เหมาะสมมีผลต่อการปลูกถ่ายยีน Benjamin และคณะ (1993) รายงานการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของ *Rauvolfia serpentina* โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายเชื้อ 15434 เท่านั้นที่สามารถปลูกถ่ายยีนได้ เวลาที่เหมาะสมในการอินคิวเบทคือ 72 ชั่วโมง ในขณะที่การอินคิวเบท 48 ชั่วโมง ให้แคลลัสต้านทานต่อคานามัยซินหลังการปลูกถ่ายยีนสูงสุด Norelli และคณะ (1994) พบว่าการอินคิวเบทเชื้อเวลา 18 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะในการปลูกถ่ายยีนกับแอปเปิ้ลพันธุ์ Malling 26 ให้ต้านทานต่อเชื้อ *Erwinia amylovora* จากการทดลองของ Raharjo และคณะ (1996) พบว่าการอินคิวเบทเชื้อเป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง เหมาะในการปลูกถ่ายยีนในแตงกวาซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนระยะเวลาในการอินคิวเบทในการทดลองนี้พบว่าการอินคิวเบทเวลา 48 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีนใบมังคุดมากที่สุด เวลาดังกล่าวการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โครงสร้างของเซลล์ และกิจกรรมภายในเซลล์เหมาะต่อการแบ่งเซลล์และการเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านหรือพืชอาศัย

ผลการสร้างแผลกับแผ่นใบแบบต่างๆ และการใช้อัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาที ให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการไม่ใช้สามารถสร้างแคลลัสหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่า พอสรุปได้ว่าการใช้อัลตราโซนิคที่เวลาดังกล่าวไม่ได้ส่งเสริมการปลูกถ่ายยีน น่าจะใช้ระยะเวลาในการใช้อัลตราโซนิคให้น้อยลงเป็นวินาที ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทดลองระยะเวลาในการใช้อัลตราโซนิค จากการทดลองครั้งแรกที่ได้ศึกษาระยะเวลาการใช้อัลตราโซนิคเพียงเวลาเดียว (10 นาที) ถึงแม้ผลการทดลองดังกล่าวสร้างแคลลัสได้น้อยก็ตาม แต่การทดลองทั้ง 2 ได้ทำในเวลาใกล้เคียงกันจึงไม่สามารถนำผลการทดลองหนึ่งมากำหนดการใช้กับอีกการทดลองหนึ่งได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้อัลตราโซนิคทำให้การกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกินได้ง่ายกว่าการไม่ใช้อัลตราโซนิค การใช้อัลตราโซนิคยังมีผลต่อการไหม้ของใบชัดเจน นอกจากนี้ Charity และคณะ (2002) ยังรายงานการใช้เทคนิคการดูดสุญญากาศ (vacuum infiltration) ว่าส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนให้กับเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของ *Pinus radiata* ได้ดี อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทดลอง ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายยีนในมังคุดครั้งต่อไปควรศึกษาปัจจัยนี้ด้วย ส่วนการสร้างแผลกับแผ่นใบทั้ง 4 แบบ พบว่าการสร้างแผลโดยตัดแบ่งใบเป็นสองส่วนตามขวางให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงสุดแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการเลี้ยงทั้งใบและการกรีดแผ่นใบตัดเส้นกลางใบตามขวาง 1-2 รอย เมื่อพิจารณาชิ้นส่วนมังคุดต่อความสามารถในการปลูกถ่ายยีน พบว่าชิ้นส่วนใบและลำต้นอ่อนให้แคลลัสหลังปลูกถ่ายยีนได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การใช้ใบอ่อนสีแดงมีแนวโน้มให้แคลลัสที่ต้านทานต่อคานามัยซินสูงกว่าการใช้ส่วนของลำต้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Sangwan และคณะ (1991) ที่ทดลองผลของการปลูกถ่ายยีนในลำโพง โดยการ

ใช้ชิ้นส่วนของลำต้น ก้านใบ และราก พบว่าชิ้นส่วนใบให้แคลลัสที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหลังการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่า ในขณะที่ Lin และคณะ (1994) พบว่าการปลูกถ่ายยีนกับลำต้นเหนือใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของยาสูบประสบผลสำเร็จสูงกว่าการใช้ราก ส่วนการปลูกถ่ายยีนในส้มโดย Pena และคณะ (1995ก, ข) พบว่าการใช้ส่วนของลำต้นมีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนได้สูงที่สุด

การทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของ GUS ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนที่ส่งเข้าสู่เซลล์ของใบมีน้อย เกิดขึ้นบริเวณรอบเนื้อเยื่อและไม่สามารถพัฒนาการต่อไปได้หรือยีนที่ถูกส่งเข้าไปอาจถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่สร้างโดยเซลล์ของใบ อย่างไรก็ตามการสร้างแผลให้กับแผ่นใบก็เป็นวิธีหนึ่งในการส่งเสริมการปลูกถ่ายยีนให้ประสบผลสำเร็จ ทำให้การส่ง T-DNA ที่อยู่บนพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น (Kingsman and Kingsman, 1988; Kosuge, *et al*., 1982) เช่นเดียวกับการทดลองของ Norelli และคณะ, (1994) ที่ทำการปลูกถ่ายยีนให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้กับใบอ่อนของแอปเปิ้ลโดยการกรีดแผ่นใบ 3-4 รอย พบว่าประสบผลสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่าการใช้ใบทั้งใบที่ไม่มีการสร้างแผลโดยการกรีดแผ่นใบ เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของ GUS จึงยังไม่มีความชัดเจนในการปลูกถ่ายยีนหรือการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่ใบมังคุด ในการศึกษานี้อาศัยยีนที่มีความต้านทานต่อคานามัยซินซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้การปลูกถ่ายยีนได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนที่ต้านทานต่อคานามัยซินดังกล่าวก็ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ นอกจากนี้พบว่าใบของมังคุดเองมีความต้านทานต่อคานามัยซินได้ระดับหนึ่ง แม้ไม่ได้มีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อก็ตาม (สมปอง และคณะ, 2545) แต่ความต้านทานดังกล่าวแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดกับใบที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนหลังการเลี้ยงร่วม การศึกษาการปลูกถ่ายยีนในมังคุดยังไม่ได้ต้นมังคุดที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนอย่างถาวรเช่นเดียวกับพืชอีกหลายชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องจากมังคุดไม่ใช่พืชอาศัยของอะโกรแบคทีเรียทำให้การทดลองดังกล่าวไม่ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาเป็นต้นได้ และมีความแตกต่างจากการทดลองอื่นอยู่บ้าง ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการใช้สารกระตุ้นการปลูกถ่ายยีน เช่น การใช้สาร acetosyringone หรืออาจใช้วิธีการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงยีนผ่านโนดูลาแคลลัส หรือแผ่นใบแทนการใช้อะไกรแบคทีเรียม

เอกสารอ้างอิง

สมปอง เตชะโต วิทูล ไชยภักดี และเริ่มอรุณ รักเผือก. 2545. ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม และคานามัยซินต่อการสร้างแคลลัส และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากใบและแคลลัสมังคุด. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 24: 561-568.

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

Charity, J.A., Holland, L., Donaldson, S.S., Grace, L. and Walter, C. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum infiltration. Plant Cell Reports 70: 51-60.

Deng, X.X. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic callus of Ponkan mandarin and the regeneration of plant containing chimeric ribonuclease gene. Plant Cell Reports 21: 153-156.

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

Jullian, N.P., Sedira, M. and Welander, M. 2002. The use of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots to obtain transgenic shoots of the apple rootstock Jork 9. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 163-171.

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

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

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

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

Maddumage, R., Fung, R.M.W., Weir, I, Ding, H., Simons, J.L. and Allan, A.C. 2002. Efficient transient transformation of suspension culture-derived apple protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 77-82.

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

Mondal, T.K., Bhattacharya, A., Ahuja, P.S. and Chand, P.K. 2001. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryo. Plant Cell Reports 20: 712-720.

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

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

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

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

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

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

Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from in vitro-derived leaf explants. Scientia Horticulturae 86: 291-298.