บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. **ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเตรียม** feeder cells

การเตรียม feeder cells จากแคลลัสจากแผ่นใบของยาสูบที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/l พบว่า แคลลัสมีลักษณะแตกต่างกัน คอมแพกแคลลัสสีเขียวและสีขาวสามารถเจริญเป็นยอดได้ในอาหาร KDMS ในเวลา 80 วัน ในขณะที่ฟรายเอเบิลแคลลัสที่มีลักษณะเซลล์ใส ไม่มีสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด เมื่อนำคอมแพกแคลลัสสีเขียว และสีขาวนี้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/l พบว่า ได้เซลล์แขวนลอยสีเหลืองอมเขียวที่เพิ่มปริมาณได้ และประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก กระจายตัวดี แต่ถ้าย้ายเซลล์แขวนลอยนี้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l และkinetin 1.0 mg/l พบว่าเซลล์แขวนลอยเจริญเติบโต และกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไป ส่วนการย้ายคอมแพกแคลลัสสีเขียว และสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l โดยตรงแคลลัสให้เซลล์แขวนลอยน้อย แต่กลับเกิด regeneration เป็นยอดจำนวนมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นฟีดเดอร์

สำหรับการเลี้ยงแคลลัสจากแผ่นใบพิทูเนียในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 mg/l พบว่า ได้แคลลัสสีเขียวอมเหลือง ลักษณะเซลล์ค่อนข้างละเอียด เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร medium B สามารถเกิด regeneration เป็นยอดได้ดี และเมื่อ นำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร medium P พบว่าได้เซลล์แขวนลอย สีเขียวอมเหลือง ลักษณะเซลล์ละเอียด และกระจายตัวดี ซึ่งใช้เป็น feeder cells ได้ การ preculture ใบเลี้ยงมะเขือเทศด้วยการวางบน feeder cells ทั้ง 2 ชนิด 24 ชั่วโมง ก่อนการทำ cocultivation พบว่า ช่วยส่งเสริมการเกิด regeneration ของใบเลี้ยงมะเขือเทศได้ในบางการทดลอง ขึ้นกับพันธุ์มะเขือเทศ ชนิดและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย รวมถึงสูตรอาหาร regeneration medium ที่ใช้การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศเป็นสีน้ำตาลในระหว่างการเลี้ยงใน regeneration medium มีผลต่อการเกิดยอด และการเจริญของต้นมะเขือเทศ

2. **ผลของการ** transformation **มะเขือเทศด้วย** *Agrobacterium tumefaciens*. pBI121

ผลของชนิดของอาหาร

จากผลการทดลอง พบว่าชนิดของอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดมีผลต่อการขยายขนาดของใบเลี้ยง การเกิด browning ของใบเลี้ยง และการเกิดยอดของมะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์จะแตกต่างกัน โดยในมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรี อาหาร medium I จะช่วยให้ใบเลี้ยงขยายขนาดมากที่สุด และเกิด browning น้อยที่สุดด้วย แต่จำนวนใบเลี้ยงที่เกิดยอดไม่สูงมากนัก จำนวนใบเลี้ยงที่เกิดยอดสูงสุดเมื่อใช้อาหาร medium III ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ medium III จะทำให้ใบเลี้ยงมีการขยายขนาดมากที่สุด และเกิด browning น้อยที่สุด และมีจำนวนใบเลี้ยงที่เกิดยอดสูงสุดด้วยเช่นเดียวกับในมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรี

ผลของชนิดของ Feeder cells และการ preculture

ผลของชนิด Feeder C ทำให้มะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์มีความกว้างเฉลี่ยของใบเลี้ยงมากที่สุด แล้วยังส่งผลให้การเกิด browning ของใบเลี้ยงของทั้ง 2 พันธุ์น้อยที่สุด และมีจำนวนใบเลี้ยงที่เกิดยอดสูงสุดด้วย รองลงไปคือ feeder B และ Feeder A ตามลำดับ

ผลของของการทำ preculture ต่อการขยายขนาดของใบเลี้ยง พบว่า เมื่อมีการ preculture บน feeder C และใช้ medium I ของมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรี กับ การผ่านขั้นตอนการ preculture บน feeder C แล้วนำไปเลี้ยงบน medium II ของพันธุ์สีดาทิพย์ จะทำให้มีการขยายขนาดของใบเลี้ยงดี และยังส่งผลให้จำนวนใบเลี้ยงที่เกิดยอดของมะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์สูงสุดด้วย และการทำ preculture ด้วย feeder C และใช้ medium III ดีที่สุด ได้ผลความกว้างของใบเลี้ยง 0.66 เซนติเมตร ซึ่งดีกว่าไม่ทำ preculture แต่พบว่า ผลของการทำ preculture อาจไม่ได้ช่วยให้ใบเลี้ยงขยายขนาดมากขึ้นเสมอไป ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของ feeder cells และอาหารชักนำให้เกิดยอดที่ใช้ และระยะเวลาที่ใช้ในการ preculture ด้วย

ผลของการเกิดยอด

จากการศึกษาวิธีการรวม 18 การทดลอง ถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และสวีทเซอรี พบว่า มะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรีมีจำนวนขวด(ซ้ำ) ที่มี regeneration 11-40% ค่อนข้างสูงกว่าพันธุ์

สีดาทิพย์ที่พบ 10-29%ใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรีเกิด regeneration ได้มากที่สุด 5-15.6% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1-2.5 ยอดต่อชิ้นใบเลี้ยง ส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์เกิด regeneration ได้มากที่สุด 2.5-7.5% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1-3 ยอดต่อชิ้นใบเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และพันธุ์สวีทเซอรี่ มีค่า putative transformation efficiency เป็น 2.5 – 18.0% และ 5.6 - 22.2% ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยของทั้งยาสูบและพิทูเนีย เมื่อนำมาใช้เป็น feeder cells โดยทำการ preculture ใบเลี้ยงมะเขือเทศด้วยการวางบน feeder cells ทั้ง 2 ชนิด 24 ชั่วโมง ก่อนการทำ cocultivation พบว่า ช่วยส่งเสริมการเกิด regeneration ของใบเลี้ยงมะเขือเทศได้ในบางการทดลอง ขึ้นอยู่กับพันธุ์มะเขือเทศ ชนิดและอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย รวมถึงสูตรอาหาร regeneration medium ที่ใช้ และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศเป็นสีน้ำตาลในระหว่างการเลี้ยงใน regeneration medium มีผลต่อการเกิดยอด และการเจริญของต้นมะเขือเทศ

1. **ตรวจสอบความเป็น** transgenic plant

จากการตรวจสอบทาง histochemical ของต้นมะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์ ที่ได้จากการถ่ายยีน พบว่าทุกต้น ที่นำมาตรวจสอบมีการแสดงออกของ *GUS* gene ซึ่งเป็น reporter gene โดยพบว่าเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินของ dichloro-dibromoindigo และมีผลยืนยันจากการทำ PCR โดยใช้ specific primers สำหรับยีน *NPT II* พบแถบของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส แสดงว่าทุกต้นที่ได้เป็น transgenic plant

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงผลของอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอด ชนิดของฟีดเดอร์เซลล์ การทำ preculture ที่มีต่อการ transformation
2. ได้วิธีการถ่ายยีนให้กับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์และพันธุ์สวีทเซอรี โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น และสามารถใช้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชอื่นต่อไป

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย