บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของการคัดเลือกแคลลัสที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็น feeder cells

จากรายงานการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ transformation มะเขือเทศพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า จำเป็นต้องใช้ feeder cells เพื่อช่วยชักนำให้เนื้อเยื่อใบเลี้ยงเกิดเป็นยอดได้เร็วที่สุด ซึ่ง feeder cells ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นพืชในวงศ์เดียวกันกับมะเขือเทศ ได้แก่ ยาสูบ (Fillatti และคณะ, 1987) มะเขือเทศ (Attathom และคณะ, 1991) และพิทูเนีย (Roekel และคณะ, 1993) แต่จากรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ และพิทูเนียสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดยอดได้ง่าย และเกิด necrosis น้อย ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศทำได้ค่อนข้างยาก เจริญเติบโตช้า และแคลลัสที่ได้มักจะเป็นแคลลัสที่มีลักษณะไม่แข็งแรงนัก สีของแคลลัสส่วนใหญ่เป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเกิดการสะสมสารประกอบฟีโนลิค(phenolic compound) ซึ่งเป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาโดยธรรมชาติของพืชเอง ทำให้เกิด necrosis ได้ง่าย หากมีการสะสมของสารประกอบนี้เกิดมากกว่าและเร็วกว่าอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อก็จะทำให้เนื้อเยื่อตายไปในที่สุด(พรทิพย์ ธนูทอง และคณะ, 2529) จึงไม่เลือกที่จะนำใช้ทำเป็น feeder cells เนื่องจากกลุ่มเซลล์ที่จะนำมาเป็น feeder cells ควรเป็นกลุ่มเซลล์ที่กำลังมีการเจริญพัฒนาเป็นอย่างดี ซึ่งจะมีการสร้างและปลดปล่อยสารควบคุมการเจริญเติบโตออกมา ทำให้สามารถกระตุ้นเซลล์อื่นที่อยู่ใกล้เคียงแบ่งตัวได้แม้จะมีจำนวนเซลล์ในอาหารน้อย (Muir, 1991 อ้างถึงใน Dodds, 1995)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบยาสูบบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 mg/l และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแผ่นใบของพิทูเนียบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.0 mg/l จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ซึ่งการเกิดแคลลัสนั้นจะขึ้นอยู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีอื่นๆ ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด โดยเฉพาะยาสูบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของออกซินต่อไซโคไคนิน ในการทดลองนี้ได้นำเอา 2,4-D มาใช้ในการชักนำให้เนื้อเยื่อแผ่นใบยาสูบและพิทูเนียเกิดแคลลัส เนื่องจาก 2,4-D เป็นออกซินสังเคราะห์มีคุณสมบัติในการไปปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะและใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวน และรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ จึงมีผลอย่างมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541) และพบว่าแคลลัสที่ได้ของยาสูบจะประกอบด้วย แคลลัสที่มีลักษณะแตกต่างกัน ส่วนแคลลัสของพิทูเนียจะมีลักษณะไม่

ค่อยแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากพืชต่างชนิดกันหรือชนิดเดียวกัน แต่ต่างเนื้อเยื่อกันจะตอบสนองต่อปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่ชักนำให้เกิดแคลลัสต่างกัน โดยพืชชนิดเดียวกันอาจให้แคลลัสเป็นทั้งชนิดที่เกาะกันแน่น แยกจากกันได้ยาก (compact หรือ hard callus) หรือชนิดที่อยู่กันหลวมๆ แยกจากกันได้ง่าย เรียกว่า ฟรายเอเบิลแคลลัส (friable callus) (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2542)

และจากการนำส่วนของแคลลัสยาสูบทั้งที่เป็นคอมแพคและฟรายเอเบิลมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร KDMS ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ทำ feeder cells พบว่า แคลลัสที่เป็นคอมแพคแคลลัสซึ่งมีสีเขียว สามารถทำการพัฒนาเป็นยอดได้ และเมื่อนำส่วนของแคลลัสพิทูเนียมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร medium B ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ทำ feeder cells พบว่าแคลลัสของพิทูเนียสามารถเกิดการพัฒนาเป็นยอดได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโตไคนินที่สูงและออกซินต่ำ (zeatin : IAA = 20 : 1) ที่มีอยู่ในอาหารซึ่งจะกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และมีอิทธิพลชักนำให้เกิดยอดได้ (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541) จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น feeder cells มากกว่าฟรายเอเบิลแคลลัสของยาสูบ ที่ไม่สามารถเจริญและชักนำให้เกิดยอดได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร KDMS ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ทำ feeder cells เนื่องจากกลุ่มเซลล์ที่จะนำมาเป็น feeder cells ควรเป็นกลุ่มเซลล์ที่กำลังมีการเจริญพัฒนาเป็นอย่างดี ซึ่งจะมีการสร้างและปลดปล่อยสารควบคุมการเจริญเติบโตออกมา ทำให้สามารถกระตุ้นเซลล์อื่นที่อยู่ใกล้เคียงแบ่งตัวได้แม้จะมีจำนวนเซลล์ในอาหารน้อย (Muir, 1991 อ้างถึงใน Dodds, 1995)

2. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์แขวนลอยของยาสูบและพิทูเนีย

จากการทดลองเมื่อนำเซลล์แขวนลอยของยาสูบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 0.1 mg/l 2,4-D และ สูตร MS ที่เติม 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l kinetin และเซลล์แขวนลอยของพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร Medium P มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ทำ feeder cells สูตร KDMS และ Medium B ตามลำดับ พบว่าเซลล์แขวนลอยของยาสูบที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS 0.1 mg/l 2,4-D มีการเจริญพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี แต่ไม่พบการเกิดยอด เนื่องจาก 2,4-D เป็นออกซินที่ส่งเสริมการเกิดแคลลัส แต่มักจะมีผลยับยั้งการเกิดอวัยวะ ส่วนเซลล์แขวนลอยของยาสูบที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l และ kinetin 1.0 mg/l และเซลล์แขวนลอยของพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Medium P นั้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ซึ่งการเกิดยอดจากแคลลัสนั้นเกิดได้ในอาหารที่มีออกซินต่ำและไซโตไคนินสูง การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสนั้น มีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องมาก ในบางกรณีเกลือความเข้มข้นสูง สามารถชักนำการเกิดยอดได้ (คำนูณ กาญจน

ภูมิ, 2542) ดังนั้น เมื่อเรานำแคลลัสยาสูบชนิดที่เป็นคอมแพค และแคลลัสของพิทูเนียไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยก่อนนำไปทำเป็น feeder cells น่าจะได้ feeder cells ที่ประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ที่มีความสามารถชักนำให้เกิดเป็นยอดได้ และเมื่อเกิดการพัฒนาไปเป็นยอด น่าจะมีการสร้างสารควบคุมการเจริญของแคลลัสด้วย โดยขนาดและลักษณะการอยู่กันเป็นกลุ่มๆ หรือเดี่ยวๆ ขึ้นกับองค์ประกอบชนิดและความเข้มข้นของอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งจะสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชที่เราเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ยากนั้น ได้รับสารควบคุมการเจริญที่ชักนำให้เกิดยอดจาก feeder cells เหล่านี้

3. ผลของการ transformation ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์และพันธุ์สวีทเซอรี่

3.1 ผลของอาหารชักนำให้เกิดยอดต่อขนาดของใบเลี้ยง

เมื่อทำการ transformation ใบเลี้ยงมะเขือเทศ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์สีดาทิพย์และสวีทเซอรี่ เปรียบเทียบชุดการทดลองทั้ง 18 ชุดการทดลอง ที่ใช้อาหารที่ชักนำให้เกิดยอด 3 สูตร คือ medium I (Fillatti และคณะ, 1987) medium II (Attathom และคณะ, 1991) และ medium III (Roekel และคณะ, 1993) ซึ่งจากรายงานพบว่าเป็นอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดที่ใช้ได้ผลค่อนข้างดีในการ transformation มะเขือเทศพันธุ์ต่างๆ แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์จากต่างประเทศ ซึ่งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนี้จะตอบสนองต่อพันธุ์มะเขือเทศต่างๆ ได้ต่างกัน จากผลการทดลองในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ พบว่า การเพาะเลี้ยงใน medium III ให้ผลดีที่สุด แต่ต้องทำการ preculture ด้วย feeder C จะได้ค่าความกว้างเฉลี่ยของใบเลี้ยง 0.66-0.67 เซนติเมตร การเพาะเลี้ยงใน medium II จะใช้ได้ผลดีรองลงมา แต่ต้องใช้ feeder แบบ B โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำ preculture ได้ค่าเฉลี่ยความกว้างของใบเลี้ยง 0.57 เซนติเมตร ในขณะที่ ถ้าผ่านขั้นตอนการ preculture จะได้ค่าความกว้างเฉลี่ยของใบเลี้ยงเพียง 0.52 เซนติเมตร ส่วนการเพาะเลี้ยงบน medium I จะให้ผลดีเป็นลำดับที่ 3 แต่ต้อง preculture ด้วย feeder A ค่าความกว้างเฉลี่ยของใบเลี้ยงที่ได้ คือ 0.52-0.53 เซนติเมตร (ตารางที่ 3) ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงใน medium I ใช้ได้ผลดีที่สุด ทั้งการผ่านขั้นตอนการ preculture และไม่ preculture ด้วย feeder C โดยค่าเฉลี่ยความกว้างของใบเลี้ยงที่ได้เท่ากับ 0.79 - 0.80 เซนติเมตร การเพาะเลี้ยงใน medium II จะใช้ได้ผลดีรองลงมา พบว่าการ preculture ด้วย feeder B จะได้ค่าเฉลี่ยความกว้างของใบเลี้ยง 0.45 - 0.47 เซนติเมตร ซึ่งไม่ต่างกับชุดการทดลองที่ไม่ preculture ที่ได้ค่าเฉลี่ยความกว้างของใบเลี้ยง 0.44 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบน medium III จะให้ผลดีเป็นลำดับที่ 3 แต่ต้อง preculture ด้วย feeder A ได้ค่าเฉลี่ยความกว้างของใบ

เลี้ยง 0.54 เซนติเมตร(ตารางที่ 39) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การตอบสนองต่ออาหารทั้ง 3 ชนิด ของมะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์มีแตกต่างกัน

3.2 ผลของชนิด feeder ต่อขนาดของใบเลี้ยง

การทดลอง transformation ใบเลี้ยงมะเขือเทศ 2 พันธุ์ มีการใช้ feeder cells 3 แบบ คือ A (เซลล์แขวนลอยยาสูบที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS + 0.1 mg/l 2,4-D), B (เซลล์แขวนลอยยาสูบที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS + 1 mg/l kinetin และ 0.1 mg/l IAA) และ C (เซลล์แขวนลอยยาสูบที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร medium P) พบว่าการใช้ feeder cells 3 แบบมีผลทำให้ขนาดใบเลี้ยงเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงสัปดาห์ที่ 2 – 4 ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ การใช้ medium II โดยใช้ feeder B ทำให้ใบเลี้ยงขยายขนาดมากกว่าการใช้ feeder A และ C อย่างมีนัยสำคัญ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ในการ transformation มะเขือเทศ สามารถใช้ feeder B ซึ่งก็คือเซลล์แขวนลอยยาสูบที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS + 1 mg/l kinetin และ 0.1 mg/l IAA ได้ดีเช่นเดียวกันกับการใช้ feeder cell เป็นเซลล์แขวนลอยมะเขือเทศดังรายงานของ Attathom และคณะ (1991) ทั้งนี้ การใช้ feeder B ในอาหาร medium II นั้น สามารถเพิ่มการขยายขนาดของใบเลี้ยงได้ดีแม้ว่าจะไม่มีการทำ preculture ก็ตาม ส่วนการใช้ feeder C และทำ preculture ด้วย พบว่าให้ผลดีที่สุดเมื่อใช้ medium III ในการชักนำให้เกิดยอด ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Roekel และคณะ (1993) ซึ่งใช้เซลล์แขวนลอยพิทูเนียร่วมกับการใช้ medium III ในการชักนำให้เกิดยอดได้ดีในมะเขือเทศพันธุ์อื่นๆ

สำหรับมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรี่ พบว่าการใช้ feeder C ให้ผลต่อการเพิ่มขนาดใบเลี้ยงได้ดีกว่า feeder A และ B เมื่อเลี้ยงใน medium I และ II โดยมีการทำ preculture ด้วย แต่กลับไม่ได้ผลดีใน medium III ผลดังกล่าวขัดแย้งกับการรายงานโดย Roekel และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าการใช้เซลล์แขวนลอยพิทูเนียนั้นควรใช้ร่วมกับ medium III จึงจะได้ผลดี จากผลที่พบในมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์นี้แสดงให้เห็นว่าความเหมาะสมของการใช้ feeder cell นั้น นอกจากจะได้ผลแตกต่างกันในมะเขือเทศต่างพันธุ์ แล้วยังต้องเลือกใช้ medium ให้เหมาะสมด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ผลของการ preculture ต่อขนาดของใบเลี้ยง

จากการรายงานที่ผ่านมา เช่น Roekel และคณะ (1993) พบว่าการทำ preculture จะมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการ transformation ในมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่ใช้ในการทำ preculture ต้องมีความเหมาะสมด้วย (Jacq และคณะ, 1993) ในการทดลองนี้ ได้ใช้เวลาในการทำ preculture 1 คืน เนื่องจากพบว่าระยะเวลาดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการ transformation ในมะเขือเทศพันธุ์อื่นๆ ได้ (Filatti และคณะ, 1987; Roekel และคณะ, 1993) อย่างไรก็ตาม การทำ preculture เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ transformation ในมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากการขยายขนาดของใบเลี้ยง พบว่าอาจไม่ได้ผลเสมอไป ทั้งนี้ ประสิทธิภาพดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น คือ ชนิดของ feeder และอาหารชักนำให้เกิดยอดที่ใช้ด้วย นอกจากนี้ ยังมีผลแตกต่างกันในมะเขือเทศต่างพันธุ์กันอีกด้วย อย่างไรก็ตาม การทำ preculture ที่พบว่าได้ผลดีกว่าการไม่ทำ preculture ในการทดลองนี้ ได้แก่ การใช้ feeder C ร่วมกับการใช้ medium III และการใช้ feeder A ร่วมกับการใช้ medium I ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์สวีทเชอรี่ การ preculture หรือ ไม่ preculture ด้วย feeder C และ B เมื่อเลี้ยงใน medium I และ medium II ตามลำดับ ให้ผลไม่แตกต่างกัน เฉพาะ feeder A เท่านั้นที่พบว่า ทำ preculture ให้ผลดีกว่าไม่ทำ preculture เมื่อใช้อาหาร medium III

3.4 การเกิด browning ของใบเลี้ยง

การเกิด browning ของใบเลี้ยงพบว่าเกิดมากขึ้นเมื่อระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้น โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด browning ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดทดลองตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 จนสิ้นสุดการทดลอง ผลดังกล่าวพบเช่นเดียวกันในมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ สำหรับสาเหตุของการเกิด browning นั้น Davis และคณะ (1991) ได้อธิบายว่าน่าจะเป็นผลมาจากกลไกการตอบสนองของพืชที่เรียกว่า hypersensitive response ที่เนื้อเยื่อมะเขือเทศมีต่อการบุกรุกของ *A. tumefaciens* ซึ่งการเกิด browning มากขึ้นเนื่องจากสาเหตุดังกล่าว มีผลทำให้โอกาสในการเกิดต้นของมะเขือเทศลดลง Tan และคณะ (1989) อ้างอิงใน Kalayawudhipong และ Attathom (1991) ได้รายงานว่าการมีปริมาณของออกซินสูงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจะเป็นสาเหตุให้เปอร์เซ็นต์การเกิด browning เพิ่มขึ้นได้ด้วย นอกจากนี้ รังสฤษดิ์ กาวิตะ (2540) ได้กล่าวถึงปัญหาการเกิดสีน้ำตาลในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าเกิดจากการออกซิเดชันของสารประกอบพวก phenolic compounds ที่ปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของเนื้อเยื่อที่ถูกตัด ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและเป็นพิษต่อ

เนื้อเยื่อพืชทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในที่สุด การแก้ไขอาจทำได้โดยเปลี่ยนอาหารให้บ่อยครั้ง หรือใช้อาหารเหลว ซึ่งจะช่วยขจัดผลของสาร phenolic และสารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibitors) อื่นๆ ได้

3.5 การเกิดยอด

การชักนำให้เกิดยอดสามารถทำได้จากการใช้ regeneration medium ทั้ง 3 สูตร ที่เตรียมโดยวิธีการของ Fillatti และคณะ (1995) Attathom และคณะ (1991) และ Roekel และคณะ (1993) ทั้งนี้ เพราะเป็นสูตรอาหารที่มีการเติม Zeatin ในปริมาณ 2.0, 1.0 และ 2.0 mg/l ตามลำดับ Zeatin เป็นสารในกลุ่ม cytokinetin จึงมีคุณสมบัติกระตุ้นการเกิดยอดได้ การศึกษาวิธีการรวม 18 การทดลองในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์และสวีทเซอรีครั้งนี้ พบว่า ในมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรี มีจำนวนขวด (ซ้ำ) ที่เกิด regeneration 11-40 % ค่อนข้างสูงกว่าพันธุ์สีดาทิพย์ ที่มีจำนวนขวดที่เกิด regeneration เพียง 10-29 % ใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์เกิด regeneration ได้มากที่สุด 2.5-7.5 % และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1-3 ยอดต่อชิ้นใบเลี้ยง ส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรีเกิด regeneration ได้มากที่สุด 5-15.6 % และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1-2.5 ยอดต่อชิ้นใบเลี้ยง ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์ พบว่า มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และพันธุ์สวีทเซอรีมีค่า putative transformation efficiency เป็น 2.5 – 18.0% และ 5.6 – 22.2% ตามลำดับ

สำหรับการพิจารณาผลของการทำ preculture ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดยอดนั้น พบว่า การทำ preculture ให้ผลต่อการเกิดยอดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของ feeder cells และสูตรอาหารที่ใช้ อย่างไรก็ดี พบว่าการทำ preculture มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดยอดได้เป็นส่วนมากในมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ กล่าวคือ ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ การใช้อาหารสูตร medium I ร่วมกับการใช้ feeder B การใช้อาหารสูตร medium II ร่วมกับการใช้ feeder B และ C และการใช้อาหารสูตร medium III ร่วมกับการใช้ feeder C โดยมีการทำ preculture ทำให้เกิดยอดมากกว่าการไม่ทำ preculture สำหรับมะเขือเทศพันธุ์สวีทเซอรี พบว่าการใช้อาหารทั้ง 3 สูตรร่วมกับการใช้ feeder cells ทั้ง 3 แบบ โดยมีการทำ preculture ด้วยนั้นทำให้เกิดยอดมากกว่าการไม่ทำ preculture อย่างมีนัยสำคัญ โดยมียกเว้นเฉพาะการใช้ medium III ร่วมกับ feeder A เท่านั้น อาจกล่าวได้ว่า ผลดังกล่าวสนับสนุนผลการทดลองของ Roekel และคณะ (1993) ที่พบว่าการทำ preculture ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการ transformation ในมะเขือเทศได้

นอกจากนี้ จากการสังเกตในระหว่างการทดลอง พบว่า ใบเลี้ยงมะเขือเทศมีอายุสั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและหลุดร่วงจากต้นกล้าภายใน 2-3 สัปดาห์หลังจากเมล็ดงอก ดังนั้น ในการ

transformation เมื่อเรานำเอาใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงใน regeneration medium จะต้องพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดเร็วที่สุดภายใน 2-3 สัปดาห์แรก ซึ่งการที่จะให้ใบเลี้ยงพัฒนาเป็นยอดได้เร็วและดีนั้น ต้องปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดให้เหมาะสม โดยศึกษาหาสัดส่วนที่พอเหมาะระหว่างออกซินและไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นให้มีการพัฒนาเป็นยอดได้เร็ว นอกจากนี้ ในการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงมะเขือเทศ ใบเลี้ยงจะมีการเจริญและโค้งงอขึ้น ทำให้มีบางส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อไม่สามารถสัมผัสอาหารจึงไม่สามารถเจริญเป็นยอดได้ ซึ่งบริเวณนั้นอาจจะเป็นบริเวณที่เซลล์ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป การแก้ปัญหาดังกล่าววิธีหนึ่ง คือ ควรจะได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสำลีเป็นวัสดุสำหรับพยุงใบเลี้ยงไว้ไม่ให้จม

4. ผลการทดสอบต้นมะเขือเทศที่คาดว่าจะเป็น Transgenic plant

4.1 ผลการตรวจสอบ GUS activity โดยวิธี Histochemical assay

จากการตรวจสอบของ Histochemical assay ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าทุกต้นที่นำมาตรวจสอบมีการแสดงออกของ GUS gene ซึ่งเป็น Reporter โดยพบว่า เนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินของ dichloro-dibromoindigo แสดงว่าทุกต้นที่ได้เป็น transgenic plant เนื่องจาก GUS gene เป็น gene ที่พบใน *E. coli* จะไม่มีในพืชชั้นสูง (Jefferson และคณะ, 1986)

4.2 ผลการแสดงออกของยีน *NPT II* ในมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน

จากผลการศึกษายีน *NPT II* ใน genomic DNA ของมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธี PCR โดยใช้ Primer ที่ specific ต่อ *NPT II* gene ซึ่งออกแบบ primers โดย Brown และคณะ,(1993) อ้างถึงใน Radchuk และคณะ; (2002) พบแถบ DNA จำนวน 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส ในตัวอย่างที่ทำการทดลอง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า แถบ DNA ที่ได้จาก การนำเอา genomic DNA ของมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนไปผ่านขั้นตอนการขยายยีน (PCR) นั้น เป็นยีน *NPT II* ที่ *A. tumefaciens*. pBI 121 ได้ทำการส่งถ่าย เข้าไปใน genomic DNA ของมะเขือเทศ และเมื่อนำลำดับของยีนของ primer ที่ใช้นี้ไป ศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับของเบสของ Binary vector pBI 121 complete sequence พบว่ามีลำดับของยีนของ primer จะเป็นคู่สมกับลำดับเบสที่ 2838 กับ 3632 ของ pBI 121 ทำให้มั่นใจได้ว่าแถบของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR จาก DNA ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และสวิทเซอรีที่ได้ ซึ่งมีขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบสนั้นเป็นแถบ DNA ที่ได้จากการขยายเพิ่ม จำนวนยีน *NPT II*