บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชวงศ์ Solanaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในบริเวณประเทศเม็กซิโก หลังจากนั้นแพร่ไปยังทวีปยุโรป ทวีปอาฟริกา และทวีปเอเซีย (สุรชัย มัจฉาชีพ, 2535)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะเขือเทศเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ วงชีวิตฤดูเดียว มีลักษณะลำต้นเป็นไม้พุ่ม ไม่มีเนื้อไม้ การเจริญของลำต้นมี 2 แบบ คือ แบบทอดยอด (indeterminate type) เช่น พันธุ์สีดาทิพย์ และแบบไม่ทอดยอด (determinate type) เช่น พันธุ์โรมาเรดแพร์ (Roma Red Pear) เป็นต้น ใบของมะเขือเทศ มีขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นหยักลึก ที่ผิวมีขนอ่อน ดอกออกเป็นช่อ ในช่อหนึ่งมีประมาณ 4-5 ดอก ดอกมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอกมีสีเหลือง 5 กลีบ เกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับเรณูมีรูปร่างยาว จำนวน 5 อัน เกสรตัวเมียอยู่ตรงกลาง ผลเป็นผลเดี่ยวแบบเบอร์รี่ (berry) ขนาดเล็กตั้งแต่ประมาณ 3 เซนติเมตร จนถึงใหญ่มากประมาณ 10 เซนติเมตร มีเมล็ดอยู่จำนวนมากในช่องว่างของผล (locule) มะเขือเทศเป็นพืชที่ชอบอากาศอบอุ่นถึงค่อนข้างเย็น สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 19-30องศาเซลเซียส ต้องการแสงแดดอย่างพอเพียง ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด โรคที่สำคัญของมะเขือเทศ ได้แก่ โรคโคนเน่า โรคใบจุดวงกลม โรคเหี่ยวจากเชื้อฟิวซาเรียม โรคยอดหงิก และอาการผิดปกติที่เกิดจากการขาดธาตุอาหาร เช่น ก้นผลเน่า ตายนึ่ง (สุรชัย มัจฉาชีพ, 2535)

การปลูกมะเขือเทศในประเทศไทยสามารถเพาะปลูกได้ตั้งแต่ช่วงปลายฤดูฝนไปจนถึงปลายฤดูหนาว และปลูกได้ผลดีในช่วงปลายฤดูหนาว ส่งผลให้ไม่เพียงพอต่อการบริโภคตลอดปี เนื่องจากมะเขือเทศเป็นพืชผักที่สำคัญที่สุดอันดับสามถัดจากมันฝรั่งและมันเทศ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2525) จึงต้องหาวิธีการต่างๆที่จะช่วยให้มีผลผลิตดีเพื่อสนองความต้องการของตลาด เช่น การปลูกในเรือนกระจกหรือการปลูกนอกฤดู ซึ่งหมายถึงการปลูกตั้งแต่เริ่มเข้าฤดูร้อนจนถึงฤดูฝน การปลูกมะเขือเทศในช่วงฤดูดังกล่าวจึงต้องเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อความร้อน ความชื้น โรคและแมลง จึงจะทำให้ได้ผลผลิตดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์เป็นมะเขือเทศรับประทานสด ผลเล็ก สีชมพู เช่นเดียวกับพันธุ์สีดา แต่มีลักษณะดีเด่นที่เหนือกว่าพันธุ์สีดา คือ ทนร้อน จึงสามารถใช้ปลูกนอกฤดูได้ นอกจากนี้ยังมีการเจริญเติบโตเป็นแบบกึ่งเลื้อย มีกิ่งแขนงมากกว่า 20 แขนง ออกดอกเร็ว ทำให้ติดผล ได้พร้อม ๆ กันเป็นจำนวนมาก ความเสี่ยงจากการเสียหายเนื่องจากโรคใบหงิกจึงน้อยกว่าพันธุ์สีดา เพราะ พันธุ์สีดามีการเจริญเติบโตแบบเลื้อยทอดยอดไปตามพื้นดินทำให้ใบและยอดมีโอกาสที่จะได้รับเชื้อโรคได้สูง เมื่อยอดแสดงอาการของโรค ต้นพืชจะชะงักการเจริญเติบโต และไม่ให้ผลผลิต (สุรชัย มัจฉาชีพ, 2535)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Plant Transformation)

เทคนิคพันธุวิศวกรรมเป็นเทคโนโลยีการตัดต่อยีนที่นิยมนำมาใช้ด้านการเกษตร เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการเพิ่มยีนให้แก่พืชพันธุ์เดิม เพื่อสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการเพิ่มขึ้น เช่น เพื่อเพิ่มความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น โรคแมลง ความแห้งแล้ง สภาพดินเปรี้ยว ดินเค็ม อุณหภูมิสูงหรือต่ำ ทำให้เกษตรกรสามารถนำพืชเหล่านี้ไปปลูกในพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมได้ และช่วยลดการใช้สารเคมี มีผลทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง นอกจากนั้นยังอาจมีเป้าหมายในการเพิ่มยีน เพื่อสร้างพืชพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น ทำให้มีมูลค่าในเชิงพาณิชย์ทั้งในด้านปริมาณผลผลิตที่สูงและคุณลักษณะของผลผลิตด้านสีสัน รูปร่าง และรสชาดเป็นที่ต้องการของตลาด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล,2539)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช เป็นวิธีการที่นำเอายีนเฉพาะที่ต้องการจากแหล่งอื่นใส่เข้าไปใน ดีเอ็นเอของพืชโดยตรง และมีการแสดงออกของยีนนั้นๆ การถ่ายยีนเข้าสู่พืชสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ การถ่ายยีนโดยใช้เข็มแทงทะลุเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อฉีดยีน (Microinjection) (Dele Pena และคณะ,1987) การถ่ายยีนโดยตรงโดยใช้สารเคมี เช่น PEG (Uchimiya และคณะ,1986) การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation) (Griesbach,1994) การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิง (Particle gun หรือ Microprojectile bombard) (Kuehnle และ Sugii,1992 ; Yang และคณะ, 1999) การถ่ายฝากยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated transformation) (McCormick และคณะ, 1986 ; Lin และคณะ, 1994 ; Chyi และคณะ, 1999) ซึ่งการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* นี้จะประสบผลสำเร็จต้องอาศัยขั้นตอนการทำ transformation ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความสามารถของ *Agrobacterium* ในการบุกรุกพืช และความสามารถในการรีเจนเนอเรทของพืช

Agrobacterium-mediated transformation
(การถ่ายฝากยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*)

การถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* เป็นวิธีที่นิยมทำกันมาก เนื่องจากทำได้ง่าย มีวิธีที่ ไม่ซับซ้อนมากนัก เสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องอาศัยเทคนิควิธีการหรือเทคโนโลยีชั้นสูง ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง และมีการพัฒนากระบวนการเป็นอย่างดีในพืชหลายชนิด (Lin และคณะ, 1994; Chyi และคณะ, 1999) สามารถถ่ายฝากดีเอ็นเอเข้าไปในพืชได้โดยใช้ โพรโทพลาสต์ กลุ่มเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ลำต้น เมล็ด เป็นต้น (Horsh และคณะ, 1985) โดยการให้ยีนที่เราต้องการจะเคลื่อนย้ายอยู่ระหว่าง border sequences ของ Ti-plasmid เมื่อพืชเกิดบาดแผล *Agrobacterium* ก็จะส่งส่วนที่อยู่ระหว่าง border sequences นี้ เข้าสู่พืชนั้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล,2539) ซึ่งการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* นี้จะประสบผลสำเร็จจะขึ้นอยู่กับความสามารถของ *Agrobacterium* ในการบุกรุกพืช และความสามารถในการเกิดรีเจนเนอเรทของเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน (Gasser และ Fraley,1989)

Agrobacterium

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน แบคทีเรียในจีนัสนี้มี 4 ชนิด ได้แก่ *Agrobacterium radiobacter, A. rhizogenes, A. rubi และ A. tumefaciens* (Bergey และคณะ, 1974) แต่ที่นิยมใช้ในการถ่ายฝากยีนในปัจจุบัน คือ *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค crown gall ในพืชกลุ่ม Gymnosperms และพืชใบเลี้ยงคู่ในกลุ่ม Angiosperms (Grierson และ Corey,1988) *Agrobacterium* โดยทั่วไปจะมีแหล่งที่อยู่อาศัยอยู่รอบๆ รากพืช (rhizophere) มีสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในพืชซึ่งสามารถตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อบริเวณบาดแผลของพืช โดยแหล่งที่อยู่อาศัยรอบๆ รากพืชของแบคทีเรียแต่ละชนิด และแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน เนื่องจากความต้องการสารอาหารในการเติบโตที่แตกต่างกัน โดยที่บริเวณรอบๆ รากพืชต่างชนิดกัน จะประกอบไปด้วยสารต่างชนิดกัน และในปริมาณที่ต่างกัน เช่น amino acids, vitamin B และ growth factors (nutritional group) ซึ่ง สารเหล่านี้จะแพร่ออกมาจากรากพืช ทำให้แบคทีเรียต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์มีความจำเพาะที่จะอยู่รอบๆ รากพืชต่างชนิดกัน และอาศัยสารอาหารที่แพร่ออกมาจากพืชใช้ในการดำรงชีวิตและจะเข้าสู่พืชโดยผ่านทางบาดแผล (subba Rao, 1997)

ในธรรมชาติเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเข้าสู่เซลล์พืชจะมีการส่งท่อน DNA ที่อยู่บนพลาสมิดของตนเข้าสู่เซลล์พืช สาย DNA ดังกล่าวจะเป็นตัวกำหนดให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวผิดปกติเกิดเป็น

เนื้องอก (Tumor) ของพืชขึ้นที่ในบริเวณที่ถูกเชื้อโรคเข้าบุกรุก นักวิทยาศาสตร์จึงนำกลไกดังกล่าวในธรรมชาติมาใช้ โดยการตัดส่วนของ DNA จากพลาสมิดที่ทำให้พืชมีการแบ่งเซลล์ผิดปกติออก แล้วนำสาย DNA ที่ต้องการ transform เข้าสู่เซลล์พืชมาใส่แทน โดยให้ยีนที่เราต้องการจะเคลื่อนย้ายอยู่ระหว่าง border sequences ของ Ti- plasmid เมื่อพืชเกิดบาดแผล *Agrobacterium* ก็จะส่งพลาสมิดที่ตัดต่อแล้วนี้เข้าสู่พืช (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2539) และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม *Agrobacterium* ก็จะส่งสาย DNA ที่ต้องการนั้นเข้าสู่นิวเคลียส โดยแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของพืช ได้อย่างถาวร หากยีนดังกล่าวมีการออกแบบยีนให้มีการควบคุมอย่างถูกต้องก็จะสามารถแสดงออก ตลอดจนสามารถถ่ายทอดสารพันธุกรรมดังกล่าวต่อไปยังลูกหลานได้ ซึ่งการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* นี้จะประสบผลสำเร็จ จะต้องอาศัยขั้นตอนการทำ transformation ซึ่งจะขึ้นอยู่กับ ความสามารถของ *Agrobacterium* ในการบุกรุกพืช และความสามารถในการเกิดรีเจนเนอเรทของเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน (Gasser และ Fraley, 1989)

กลไกในการเคลื่อนย้าย T-DNA เข้าสู่เซลล์ของพืช

กลไกในการเคลื่อนย้ายยีนจาก *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่เซลล์ของพืช มีกลไกการเกิดหลายขั้นตอนดังภาพที่ 1

ขั้นตอนแรก Bacterial colonization จะเป็นขั้นตอนที่จะทำให้ *Agrobacterium* สายพันธุ์นั้นๆมีความจำเพาะต่อพืชชนิดและพันธุ์ต่างๆ Ti - plasmid ของ *Agrobacterium* จะมีรหัสพันธุกรรมสำหรับการสร้าง specific chemotaxis receptors ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้แบคทีเรียมีความสามารถจดจำกับสารพวกน้ำตาลและสารประกอบ phenolics เช่น Acetosyringone ที่หลั่งออกมาจากบาดแผลของพืช ทำให้ *Agrobacterium* สามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณบาดแผล โดยกลไกแบบ Chemotaxis (Suzuki และคณะ, 2000 ; Cangelosi และคณะ, 1989) หลังจากนั้น *Agrobacterium* จะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า Pilli or pillus-like structure มาเชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์พืชเพื่อเป็นทางผ่านในการเคลื่อนย้าย T-DNA ซึ่งคือบริเวณของ DNA ที่อยู่ระหว่าง border sequences บน Ti - plasmid จาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์ของพืช (Fullner และคณะ, 1996 ; Szuromi, 1996 ; Chan และคณะ, 2000 ; Gelvin, 2000)

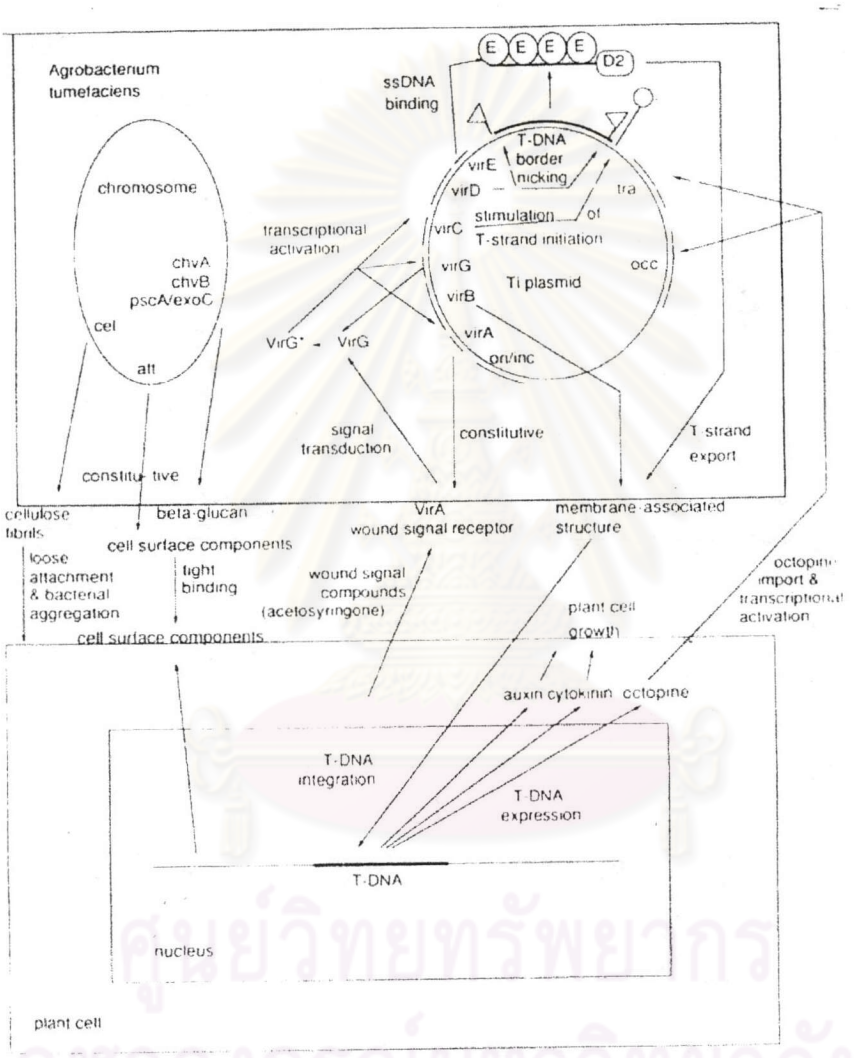
สารประกอบ phenolic เช่น Acetosyringone นอกจากจะมีบทบาทในการกระตุ้นให้ *Agrobacterium tumefaciens* เคลื่อนที่เข้าหาพืชแล้วยังไปกระตุ้น virulent genes (*Vir* genes) ที่อยู่บน Ti-plasmid ซึ่งประกอบด้วยยีนประมาณ 25 ยีน (Kalogeraki และคณะ, 1999) โดยมี operon ที่จำเป็นในการส่งถ่ายยีนอย่างน้อย 8 operons ได้แก่ *vir A, vir B, vir C, vir D, vir E*

และ *vir F*, vir G และ*vir* H (Jin และคณะ, 1990; Berger และคณะ., 1994; Hapfelmeirer และคณะ, 2000 ; Stachel และคณะ, 1985)

Vir A โปรตีนจะเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เป็น Sensory histidine protein kinase โดยเมื่อ Vir A ถูกกระตุ้นจะถูกชักนำให้เกิด autophosphorylation ใน Vir A ที่ตำแหน่ง His-474 แล้วส่งถ่ายหมู่ฟอสเฟตต่อไปยัง Vir G ที่ตำแหน่ง Asp-25 ทำให้ Vir G สามารถทำงานได้ โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ *vir* genes อื่นๆ ต่อไป (Peng และคณะ, 1998; Pan และคณะ, 1999; Lea และคณะ, 1993) โดย *vir* B_7, *vir* B_8, *vir* B_9 และ *vir* B_{10} จะสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ transport pore ซึ่งเชื่อมโยงระหว่างเซลล์ของ *Agrobacterium* กับเซลล์ของพืช เพื่อเป็นทางผ่านของ Ti plasmid และโปรตีนที่เกี่ยวข้องซึ่งจะอยู่ในรูปของ T-DNA-Protein complex โดย Vir B_7 และ Vir B_9 จะประกอบกันเป็น complex อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ส่วน Vir B_8 และ Vir B_{10} โปรตีนจะประกอบกันเป็น complex อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในแล้วโปรตีนทั้ง 2 complex นี้จะเชื่อมต่อกันเป็น transport pore (Dass, 2000; Ward, 1991; Escudo และคณะ, 1995)

โปรตีน Vir C_1, Vir C_2, Vir D_1 และ Vir D_2 จะเข้าเกาะกับ T- DNA ที่จะส่งเข้าไปในเซลล์ของพืช โดย *Vir C* จะเป็นตัวกำหนดความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และชนิดของพืชที่จะเข้าบุกรุก Vir D_1 และ Vir D_2 มีบทบาทในการจดจำบริเวณขอบเขตทางซ้าย (Left Border,LB) และ ขอบเขตทางขวา (Right Border,RB) และเป็น endonuclease ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของดีเอ็นเอ ที่จุด RB และ LB ของ T- DNA ทำให้เกิด T- DNA สายเดี่ยว นอกจากนี้ Vir D_2 โปรตีนจะยึดติดกับบริเวณปลาย 5' ของ T- DNA ทำหน้าที่เป็นโปรตีนนำทาง (pilot protein) ในกระบวนการส่งถ่าย T- DNA เข้าสู่เซลล์ของพืช และเป็น nuclear-targeting signal เพื่อเคลื่อนย้าย T- DNA ไปยังนิวเคลียสของพืช โดยในเซลล์ของพืชจะมี Vir D_2 NLS receptors และ Vir E_2 NLS receptors ซึ่งจะมาจับกับโปรตีน Vir D_2 และโปรตีน Vir E_2 ซึ่งเกาะหุ้มอยู่โดยรอบตลอดความยาวของสาย T- DNA เป็น complex ใหญ่ และนำเข้าสู่เยื่อหุ้มนิวเคลียสของพืช โดย T- DNA นี้จะเข้าไปแทรกในโครโมโซมของพืชต่อไป (Streips Vldis, 1991; Sheng และ Citovsky, 1996 ; Chan และคณะ, 2000)

นอกจากนี้ยังมี *vir* genes อื่นๆ ที่ไม่จำเป็นต่อการ transformation ได้แก่ *vir J, vir L, vir F* โดย *vir F* จะทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนเข้าไปในเซลล์ของพืชและ *vir J* จะทำหน้าที่สังเคราะห์ Periplasmic protein ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Agrobacterium* ในพืช (Chan และคณะ, 2000 ; Kalogeraki และคณะ,1999)



รูปที่1 กลไกการส่ง T-DNA ของ *Agrobacterium* เข้าสู่พืช (Streip และ Uldis,1991)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในพืช

สำหรับการนำ *Agrobacterium* มาใช้ในการ transformation พืชในห้องปฏิบัติการ ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยทั่วไปได้แก่ ความเข้มข้นของ *Agrobacterium* ที่ใช้ (Lin และคณะ, 1994) สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* อายุและชนิดของชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้ พันธุ์ของพืช การเกิด necrosis (necrosis response) ผลของ feeder cells ผลของ phenolic compound อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และยาปฏิชีวนะที่ใช้ ซึ่งผลของแต่ละปัจจัยมีดังนี้

1. ความเข้มข้นของ *Agrobacterium tumefaciens*

Davis และคณะ (1991) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อใบเลี้ยงของมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ได้แก่ Ohio Roma และ VCD82b โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A281 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ $2x10^3$ ถึง $7x10^9$ colony forming unit ml^{-1}($cfu.ml^{-1}$) พบว่าที่ความเข้มข้น $5x10^8$ $cfu.ml^{-1}$ จะมีประสิทธิภาพของการ transformation ดีที่สุดในมะเขือเทศ ทั้ง 3 พันธุ์ และประสิทธิภาพจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อความเข้มข้นของ *A. tumefaciens*. ต่ำกว่า $2x10^7$ cfu ml^{-1} และมากกว่า $5x10^8$ $cfu.ml^{-1}$ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของ *Agrobacterium* สูงๆ ชิ้นเนื้อเยื่อของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์จะเกิด necrosis มากกว่า เมื่อใช้ *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยความเข้มข้นของ *Agrobacterium* และเปอร์เซ็นต์การเกิด necrosis ของชิ้นเนื้อเยื่อจะแสดงความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้นตรงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Filatti และคณะ (1987) (อ้างถึงใน Davis และคณะ, 1991)

จากรายงานของ Lin และคณะ (1994) ได้แสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นของเซลล์ *A. tumefaciens* ขณะที่ทำ transformation มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Arabidopsis thaliana*. และยาสูบ (*Nicotiana tubacum. L*)

2. สายพันธุ์ของ *Agrobacterium tumefaciens*

ได้มีรายงานว่า ความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* พันธุ์ของ host มีความสำคัญมากในการ transformation ในพืชหลายชนิด (Anderson และ Moore, 1979, Owens และ Cress, 1985; Komari, 1989 อ้างถึงใน Godwin และคณะ 1991) จากผลการทดลองของ Davis และคณะ (1991) ซึ่งได้ทดลอง transformation โดยใช้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ 3 พันธุ์ คือ Ohio7870 Roma และ UCD82b โดยใช้ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ A6, A66 และ A281 พบว่า *A. tumefaciens* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ

ทั้ง 3 พันธุ์ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยยังพบว่า *A. tumefaciens*. สายพันธุ์ A6 จะทำให้เกิดการ necrosis มากกว่าอีก 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้ Roekel และคณะ,1993 ยังพบว่า *A. tumefaciens* ชนิด L,L-succinamopine จะให้ความถี่ในการ transformation มะเขือเทศมากกว่าชนิด Octopine และ Nopaline

3. อายุและชนิดของชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ

ในการทำ transformation ของพืชแต่ละชนิดอายุและชนิดของชิ้นเนื้อเยื่อจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เช่น ในมะเขือเทศ (Davis และคณะ, 1991) และมะละกอ (Pong และ Sanford,1988 อ้างถึงใน Davis และคณะ,1991) มีรายงานว่า การใช้ใบแก่จะให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าการใช้ใบอ่อน โดยพบว่า ใบที่มีอายุมากนั้นเมื่อนำมาทำ transformation จะเกิดการ necrosis น้อยกว่าใบที่มีอายุน้อย อย่างไรก็ดีใน *Lotus corniculatus* กลับพบผลที่ตรงข้าม คือ การถ่ายยีนโดยใช้แผ่นใบที่อายุน้อยจะได้ผลดีกว่า (Armstead และ Webb,1987 อ้างถึงใน Davis และคณะ, 1991) นอกจากนี้สำหรับมะเขือเทศ แม้จะมีรายงานว่าการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศนั้นสามารถถ่ายยีนให้กับแผ่นใบและใบเลี้ยงได้ แต่ส่วนใหญ่จะพบว่า การถ่ายยีนเข้าสู่ใบเลี้ยงจะมีประสิทธิภาพของการถ่ายยีนที่สูงกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่แผ่นใบ (Davis และคณะ, 1991; Attathom และคณะ, 1991) Jacq และคณะ,(1991) ได้ทำการ transformation ใน Sugar beet (*Bata vulgaris*) พบว่า ใช้ cotyledon ดีกว่าใช้ hypocotyl

4. พันธุ์ของพืช

ได้มีการศึกษาพบว่าความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ *A. tumefaciens* กับพันธุ์ของ host มีความสำคัญมากในการ transformation ในพืชหลายชนิด Attathom และคณะ (1991) และ Davis และคณะ, (1991) ได้ทำการ transformation โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจะขึ้นกับพันธุ์ของมะเขือเทศ นอกจากนี้ใน moth bean (*Vigra aconitifolla*) ก็พบว่าพันธุ์พืชที่แตกต่างกันก็ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนต่างกันด้วย (Eupenkohler และคณะ, 1987 อ้างถึงใน Davis และคณะ, 1991)

5. การเกิด necrosis (necrosis response)

Davis และคณะ (1991) ได้ทำการ transformation ในมะเขือเทศ 3 พันธุ์ คือ Ohio7870 Roma และ UCD82b โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่ามะเขือเทศพันธุ์ UCD82b จะเกิด necrosis เร็วกว่าอีก 2 พันธุ์ โดยการเกิด necrosis อาจจะมีผลมาจากกลไกการตอบสนองของพืชที่เรียกว่า hypersensitive response ที่ตอบสนองต่อการบุกรุกของ *A. tumefaciens* และจากการทดลอง

ของ Attathom และคณะ(1991) พบว่า เนื้อเยื่อที่เกิด necrosis เพียงเล็กน้อย หลังจากทำการ cocultivation จะรีเจนเนอเรทเป็นต้นได้ดีกว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่มีบริเวณ necrosis ขนาดใหญ่

6. ผลของ Feeder cell หรือ Nurse tissue

Muir (1991; อ้างถึงใน Dodds และ Roberts, 1985) ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง single cell โดยการนำเอา single cell มาเลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางบน nurse culture ที่กำลังมีการเจริญพัฒนาเป็นอย่างดีโดยกระดาษกรองจะซับเอาสารอาหารจากชิ้นอาหารเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สร้างและปลดปล่อยออกมาจาก nurse culture ทำให้ single cell ที่นำมาเพาะเลี้ยงได้รับสารที่ช่วยในการเจริญพัฒนาให้เจริญพัฒนาเป็นต้น ได้มีผู้พยายามศึกษาความต้องการของพืช พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตดีจะปล่อยสารที่ช่วยในการเจริญ (growth promoting substances) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์อื่น ที่อยู่ใกล้เคียงแบ่งตัวได้ แม้จะมีความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารน้อย (Low cell density) เช่น มีรายงานว่า ก้อนเนื้อเยื่อแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตดีจะสามารถช่วยเสริมให้เซลล์เดี่ยวเกิดการแบ่งเซลล์ได้ โดยเมื่อนำเซลล์เดี่ยววางบนก้อนแคลลัสที่มีกระดาษกรองกั้นอยู่เซลล์เดี่ยวจะได้รับสารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตจากแคลลัสที่ทำหน้าที่เป็นเนอร์ส (nurse) โดยการแพร่ผ่านกระดาษกรอง ทำให้มีการเจริญแบ่งตัวเกิดขึ้น

จากการศึกษาของ Roekel และคณะ (1993) พบว่า 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy-acetic acid) สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศที่ไม่สามารถรีเจนเนอเรทเป็นต้นให้กลับพัฒนาเกิดเป็นต้นได้ และเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง 2,4-D และ feeder cell layers ของพิทูเนีย พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ในทางกลับกัน 2,4-D ทำให้สูญเสียประสิทธิภาพในการ transformation ดังนั้น การใช้ feeder cell layers ของพิทูเนียร่วมกับการ preincubation 1 คืน จึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของการ transformation มะเขือเทศ ซึ่งอาจจะเป็นผลของการทำงานร่วมกันของ signal molecules ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ของพิทูเนีย และจากบาดแผลของเนื่อเยื่อใบเลี้ยงของมะเขือเทศ ทำให้มีผลต่อการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง *Agrobacterium* กับใบเลี้ยงของมะเขือเทศ เนื่องจาก feeder cell layers ของพิทูเนียสามารถผลิตสารบาง ชนิด (phenolic substances) ได้ดีกว่าส่วนอื่น ซึ่งช่วยกระตุ้นให้ *vir* gene บน Ti -plasmid ของ แบคทีเรียทำงานได้ดี

7. ผลของ phenolics compounds

Godwin และคณะ, 1991 ได้ทดลองทำการ transformation ในพืช 5 ชนิด ด้วย *A. tumefaciens*. 3 สายพันธุ์ พบว่า acetosyringone ที่ให้จากภายนอก ช่วยส่งเสริมให้

A. tumefaciens A281 ก่อโรคได้รุนแรงในถั่วเหลือง (*Glysine max)* สายพันธุ์หนึ่ง เนื่องจากถั่วเหลืองพันธุ์นี้ปกติจะสร้าง phenolics compound จากบาดแผลไม่เพียงพอที่จะชักนำให้ *vir* genes ทำงาน ในการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งมีรายงานผลการทดลองที่คล้ายคลึงกัน โดย Owens และ Smigocki (1988) อ้างถึงใน Godwin และคณะ,(1991) ; James และคณะ, (1993) แต่ในบางกรณีพบว่า acetosyringone กลับทำให้ความรุนแรงของโรคที่ก่อโดย *A. tumefaciens* A281 ลดลง เนื่องจาก Acetosyringone เป็นพิษต่อเซลล์ของ *A. tumefaciens* (Stachel และคณะ, 1985 อ้างถึงใน Godwin และคณะ, 1991)

8. ผลของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการถ่ายยีนเข้าไปยังพืช ต้องอาศัยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นพื้นฐานสำคัญ ดังนั้นก่อนที่จะนำเทคนิคการถ่ายยีนไปใช้จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นๆ เพื่อให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ก่อน การเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศบางพันธุ์ยังทำได้ค่อนข้างยาก (Ling และคณะ,1998) เนื่องจากมีข้อจำกัดในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญและพัฒนาการของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของมะเขือเทศให้เป็นไปตามที่คาดหมาย นอกจากนี้การคิดค้นวิธีการปฏิบัติที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน เพื่อการผลิตในเชิงปริมาณยังทำได้ค่อนข้างยาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เซลล์สามารถพัฒนาเป็นต้นสิ่งที่สำคัญ ก็คือ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในเรื่องของ Plant hormone ที่ใช้ และ pH ของอาหาร (Bigot และคณะ,1977 ; Frankenberger และคณะ,1981 ; Zapata และ Zink,1981 อ้างถึงใน พรทิพย์ ธนูทอง และคณะ, 2529)

Godwin และคณะ, 1991 ได้ทำการทดลอง transformation พืช 5 ชนิดด้วย *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ พบว่า pH ในระหว่างการ cocultivation จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการ transformation ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของหลายๆ กลุ่ม พบว่า pH ที่เหมาะสมในการชักนำให้ *vir* genes ทำงานได้ดีอยู่ที่ pH ต่ำกว่า 5.1 ซึ่งจะต่ำกว่า pH ของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วๆ ไป ซึ่งจะอยู่ในช่วง pH 5.8-6.0 (Stachel และคณะ, 1986 ; Vernade และคณะ, 1988 อ้างถึงใน Godwin และคณะ, 1991)

McCormick และคณะ 1986 ได้ทำการ transformation มะเขือเทศ โดยใช้ชิ้นเนื้อเยื่อจากแผ่นใบเลี้ยงและ hypocotyl จากมะเขือเทศ 15 พันธุ์และ *A. tumifaciens* 2 สายพันธุ์ และใช้อาหารที่มีฮอร์โมนพืชต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกันจำนวน 6 สูตร พบว่ามะเขือเทศพันธุ์ต่างๆ จะให้ประสิทธิภาพในการ transformation แตกต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีฮอร์โมนในปริมาณที่ต่างกันหรือต่างชนิดกัน

9. Preculture และ ระยะเวลาที่ใช้ในการ cocultivation

จากรายงานของ Jacq และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่า การทำ preculture เนื้อเยื่อ hypocotyl และ ใบเลี้ยงของ Sugar beet ก่อนจะนำมาทำการ transformation และช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการ preculture จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนเข้าสู่ Sugar beet แต่อย่างไรก็ดี พบว่า 20 เปอร์เซนต์ของใบเลี้ยงที่นำมาทำ transformation จะกลายเป็นสีน้ำตาล (necrosis) เช่นเดียวกันกับในสตรอเบอรี (Nehra และคณะ, 1990 อ้างถึงใน Jacq และคณะ, 1993)

10. ผลของการใช้ยาปฏิชีวนะ

ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัย *Agrobacterium* มีขั้นตอนที่ใช้ยาปฏิชีวนะอยู่ 2 ระยะ คือ ขั้นตอนภายหลังการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับ *Agrobacterium* (co-cultivation) ซึ่งคาดว่ามีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้วจึงใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อเลือกกำจัด *Agrobacterium* คงเหลือไว้แต่เนื้อเยื่อพืชให้เจริญเป็นต้นในสภาพปลอดเชื้อต่อไป ส่วนอีกขั้นตอนหนึ่ง คือ ขั้นตอนการทดสอบและคัดแยกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้น จะมียีนต้านยาปฏิชีวนะบางชนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นยีนเครื่องหมาย (marker gene) ด้วย เพื่อความสะดวกในการตรวจสอบและคัดเลือก เช่น neomycin phosphotransferase (*nptII*) ซึ่งเป็น kanamycin resistant gene และ hygromycin phosphotransferase (*hpt*) ซึ่งเป็น hygromycin resistant gene เป็นต้น การใช้ยาปฏิชีวนะในขั้นตอนหลังนี้จึงขึ้นอยู่กับชนิดของยีนเครื่องหมาย ส่วนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อจุดประสงค์ในการกำจัด *Agrobacterium* นั้น นอกจากจะต้องเลือกใช้ชนิดของยาที่ยับยั้งการเจริญของ *Agrobacterium* ได้แล้วในขณะเดียวกับยาดังกล่าวยังต้องมีความเป็นพิษต่อเซลล์พืชต่ำอีกด้วย เพื่อจะได้ไม่เป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และการเกิดเป็นยอด โดย มีรายงานว่า ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะมีผลต่อการสร้างแคลลัสและการเกิดเป็นยอดในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Caltin, 1990;Mathias และ Boyd, 1986; Pollock และคณะ 1983; Sarma และคณะ, 1995; Yepes และคณะ 1994)

ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว ได้แก่ ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม penicillins และ cephalosporins ชนิดที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ carbenicillin และ cefotaxine ทั้ง carbenicillin และ cefotaxine มีโครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วย β-lactam ring มีฤทธิ์กว้างสามารถทำลายแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีฤทธิ์ขัดขวางการสร้าง ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ไม่มีผลต่อเซลล์พืช อย่างไรก็ดีการใช้ carbenicillin และ cefotaxine ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิด ปรากฏว่ามีผลกระทบต่อการเจริญ ของเนื้อเยื่อพืชแตกต่างกัน กล่าวคือ carbenicillin 250-500 μg/ml จะส่งเสริมการเจริญของแคลลัส กระตุ้นการเกิดยอดและราก

ใน *Antirrhinum majus.* ในขณะที่ cefotaxime ที่ความเข้มข้นเดียวกันให้ผลตรงข้าม (Holford และ Newberg, 1992) แต่ในการเลี้ยง somatic embryos ของ Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) พบว่า carbenicillin 500 µg/ml ยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ และ somatic embryos อย่างชัดเจน ในขณะที่ cefotaxime ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อสนชนิดนี้ และมีผลต่อการพัฒนาของ somatic embryos น้อยกว่า carbenicillin (Sarma และคณะ, 1995) นอกจากนี้ในการทดลองชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อใบ apple พันธุ์ต่างๆ ในหลอดทดลอง พบว่า cefotaxime 250 µg/ml ช่วยให้เนื้อเยื่อใบเจริญเป็นแคลลัสและยอดได้ดีกว่าการทดลองชุดควบคุม ในขณะที่ carbenicillin หรือ cefotaxime 500 µg/ml เพียงอย่างเดียว และการใช้ carbenicillin 500 µg/ml ร่วมกับ cefotaxime 250 µg/ml มีผลทำให้เนื้อเยื่อใบ apple เจริญเป็นแคลลัสได้แต่ยับยั้งการเกิดยอด (Yepes และ Aldwinckle, 1994)

Lin และคณะ1995 ได้ทำการทดลอง transformation แผ่นใบยาสูบด้วย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 C58 และ EHA101 พบว่า เมื่อใช้ carbenicillin 250 µg/ml และ 2,4-D 1 µg/ml จะส่งผลความเป็นพิษต่อเซลล์ยาสูบ โดยการเกิดต้นจากเนื้อเยื่อแผ่นใบยาสูบจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก Carbenicillin มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีโครงสร้างคล้าย 2,4-D ดังนั้นเมื่อมีการใช้ Carbenicillin ร่วมกับ 2,4-D จะทำให้ระดับของออกซินสูงจนเป็นพิษต่อเซลล์ได้

Ling และคณะ 1998 ได้ทำการทดลอง transformation เนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์ Money maker ด้วย *A. tumifaciens* เมื่อใช้ Cefotamime ในการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อมะเขือเทศ พบว่า จะไม่ยับยั้งการเกิดแคลลัส แต่การเกิดต้นจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน และเมื่อมีการใช้ Cefotaxime ร่วมกับ Kanamycin จะส่งผลในทางลบต่อการเกิดแคลลัส การเกิดต้น และประสิทธิภาพในการ transformation

พัชรา ลิมปนะเวช และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองใช้ยาปฏิชีวนะ carbenicillin cefotaxime และ vancomycin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งใช้ชนิดเดียวและใช้ร่วมกันในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของ *Agrobacterium tumefaciens* และการใช้ยาปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวในอาหารชักนำให้เกิดยอดที่ใช้ เลี้ยงในใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ พบว่า carbenicillin ที่ความเข้มข้น 200-300 µg/ml มีผลกระทบต่อการเกิดยอดจากใบเลี้ยงของมะเขือเทศ ส่วน vancomycin ที่ความเข้มข้น 300-500 µg/ml มีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดยอดจากใบเลี้ยงมะเขือเทศได้ดี สำหรับ cefotaxime นั้น ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ไม่ได้ช่วยเพิ่มจำนวนยอด แต่มีผลส่งเสริมการเจริญของยอดทำให้มีความสูงมากกว่า และมีการพัฒนาของใบดีกว่า ส่วนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารชักนำให้เกิดยอดนั้น เมื่อใช้ cefotaxime 200 µg/ml ร่วมกัน vancomycin 50 µg/ml ให้ผลดีกว่าการใช้ carbenicillin 100 µg/ml ร่วมกับ cefotaxime

50 µg/ml แต่การรีเจนเนอเรทของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศ ไม่ต่างจากการทดลองชุดควบคุม และการใช้ยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวบางการทดลอง

การถ่ายยีนในมะเขือเทศโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*

มีรายงานการถ่ายยีนในมะเขือเทศโดยใช้ *A. tumefaciens* ประสบความสำเร็จในการใช้เนื้อเยื่อใบของมะเขือเทศ 8 พันธุ์ (McCormick และคณะ,1986) และเนื้อเยื่อใบเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์ Moneymaker (Roekel และคณะ, 1993) และจากโปรโตพลาสต์ของมะเขือเทศ 6 พันธุ์ (Niedz และคณะ,1985) แต่ประสิทธิภาพยังไม่สูง อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าว จำกัดสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์ที่มีการปลูกในประเทศไทย เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการ transformation เช่น ชิ้นส่วนต่างชนิดกันจะเหมาะสมกับอาหารสูตรที่แตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับพันธุ์ของมะเขือเทศด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลอง ที่ให้ผล transformation ในมะเขือเทศพันธุ์ต่างประเทศที่ได้ผลค่อนข้างดี มีดังนี้

Fillatti และคณะ(1987) ได้ทำการปรับปรุงวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยอาศัย *Agrobacterium* โดยการรวมวิธีการของ Calgene USDA และ Pillsbury โดยใช้ใบเลี้ยงมะเขือเทศ preculture ร่วมกับ feeder cells ของยาสูบในอาหารที่มี MS salts,sucrose 30 g/l Thiamine 0.4 mg/l Inositol 0.1 mg/l 2,4-D 3.0 mg/l และ Kinetin 0.1mg/l เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทำ co-cultivation กับ *Agrobacterium* บนฟีดเดอร์เซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบน regeneration medium ที่ประกอบด้วย MS salts Nitsch's vitamins และ zeatin 2.0 mg/l

Roekel และคณะ, (1993) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความถี่ของการเกิด transformation ใน มะเขือเทศพันธุ์ Moneymaker โดยนำใบเลี้ยงของมะเขือเทศมา preculture ใน Petri dish ที่มีอาหาร MS salts B_5 vitamins zeatin 2.0 mg/l และ IAA 0.1mg/l และใช้ petunia cells suspension เป็น feeder layer ทำการ incubate ไว้ 1 คืนก่อนที่จะนำใบเลี้ยงมาจุ่มใน *Agrobacterium* inoculum แล้วนำกลับมาวางบน feeder layer เช่นเดียวกับตอน preculture อีกครั้ง ทำการ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงย้ายใบเลี้ยงไปยัง selection medium และ regeneration medium ต่อไป เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้ petunia cells feeder layer กับการใช้ 2,4-D 0.05 -0.1 mg/l ทั้งก่อนและระหว่างการทำ cocultivation กับเฉพาะระหว่างการทำ cocultivation พบว่าการใช้ feeder layer ให้จำนวน Transformant สูงกว่าการใช้ 2,4-D อย่างมีนัยสำคัญ และ การใช้ feeder layer ทั้งก่อนและระหว่าง cocultivation ให้ผลดีที่สุดถึงกว่า 60 ยอด

สำหรับการถ่ายยีนในมะเขือเทศ โดย Attathom และคณะ, (1991) ซึ่งทดลองใน มะเขือเทศจำนวน 7 พันธุ์นั้น พบว่าประสิทธิภาพในการถ่ายยีนขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อพืช และใบเลี้ยงเป็นส่วนที่ใช้ได้ผลดีกว่าใบ และยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พืชด้วย ในรายงานดังกล่าว มีการทดลองกับมะเขือเทศสีดาได้ผลถึง 26.08% transformant จากใบเลี้ยง และเพียง 4% transformant จากแผ่นใบ ส่วนพันธุ์ SVRDC-4 ที่ทดลองใช้เฉพาะแผ่นใบ พบว่าไม่ได้ transformant เลย วิธีการที่ใช้ คือ ใช้ใบและใบเลี้ยงจากต้นมะเขือเทศที่ปลูกในเรือนทดลอง นำมาเลี้ยงบนอาหาร MS salts B_5 vitamins 2,4-D 2.0 mg/l และ kinetin 0.1mg/l เลี้ยงในที่มืด 2 วัน จากนั้นนำมา cocultivate กับ *Agrobacterium* โดยจุ่มลงใน bacterium suspension 5 –10 นาที จากนั้นนำไปวางบน feeder layer ที่มี cells suspension ของมะเขือเทศกระจายอยู่บนอาหารวุ้นชนิดเดิม เลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง ก่อนย้ายไปยัง selection medium เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ subculture แคลลัส และยอดที่เกิดขึ้นทุก 2-3 สัปดาห์ จะได้ต้นที่มีราก เพื่อนำไปทดสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

จากการศึกษาทั้ง 3 รายงานการทดลอง พบว่ามีการใช้ฟีดเดอร์เซลล์ที่แตกต่างกัน คือ ฟีดเดอร์เซลล์ของยาสูบ (Filatti และคณะ, 1987) ของมะเขือเทศ (Attathom และคณะ, 1991) และของพิทูเนีย (Roekel และคณะ, 1993) แต่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากแผ่นใบของพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสมะเขือเทศทำได้ค่อนข้างยากเจริญเติบโตช้า และเกิด necrosis ได้ง่าย จึงไม่นำมาใช้ในการทำเป็นฟีดเดอร์เซลล์ และการทดลองทั้ง 3 การทดลอง พบว่า มีการใช้อาหาร regeneration medium ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่าวิธีดังกล่าวไม่เป็นผลดีสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย เช่นพันธุ์สีดาทิพย์และพันธุ์สวีทเชอรี่ เป็นต้น เนื่องจากมะเขือเทศพันธุ์จากต่างประเทศและพันธุ์ไทยมีลักษณะทางพันธุกรรมบางประการที่แตกต่างกัน ทำให้ morphology และ physiology บางประการแตกต่างกันด้วย ทำให้การตอบสนองต่ออาหาร และฟีดเดอร์เซลล์ได้ต่างกัน จึงควรมีการศึกษาปรับปรุงวิธีการให้เหมาะสมกับการถ่ายยีนให้กับมะเขือเทศพันธุ์ที่นิยมปลูกกันในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการทดสอบหาชนิดและวิธีการเตรียมฟีดเดอร์เซลล์ที่เหมาะสม เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อของใบเลี้ยงของมะเขือเทศเกิด regeneration ได้ดีขึ้นในการทำ transformation พร้อมทั้งศึกษาสูตรอาหาร และ ขั้นตอนที่เหมาะสมที่จะทำให้เนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่ทำ transformation สามารถที่จะ regenerate ได้ดี มะเขือเทศ 2 พันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง คือ พันธุ์สีดาทิพย์และพันธุ์สวีทเชอรี ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภค และได้รับการปรับปรุงให้เป็นพันธุ์ที่ทนร้อนเหมาะสมที่จะเพาะปลูกในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ดี มะเขือเทศทั้งสองพันธุ์นี้ค่อนข้างอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งโรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะ โรคใบหงิก ใบม้วนเนื่องจากไวรัส และโรคใบเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (bacteria wilt) ซึ่งเป็นโรคที่พบระบาดรุนแรงในเขต

ร้อนชื้น เมื่อพืชเป็นโรคแล้วมักตายหรือแคระแกรน ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต การปลูกพืชหมุนเวียนและการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคเหล่านี้กระทำได้ยากและไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคมีพืชอาศัยกว้างขวางตั้งแต่พืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืช สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้นาน และค่อนข้างต้านทานต่อสารเคมีและยาปฏิชีวนะหลายชนิด นอกจากนี้ เชื้อยังมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอยู่เสมอทำให้เกิด strain หรือ race ต่างๆ มากมาย ทำให้เกษตรกรต้องเลิกการเพาะปลูกหันไปปลูกพืชชนิดอื่นแทน ทำให้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อการบริโภค ทำให้มีการพยายามที่จะปรับปรุงคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคด้วยวิธีต่างๆ (ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ ศักดิ์ สุนทรสิงห์ , 1995)

ในอนาคตหากจะมีการพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของมะเขือเทศสองพันธุ์นี้ การทราบถึงวิธีการและสภาวะที่เหมาะสม จึงเป็นข้อมูลหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาพันธุ์ด้วยเทคนิคดังกล่าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย