บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อยพันธุ์พันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าแคลลัสส่วนใหญ่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มีสีเหลืองอ่อนหรือสีเหลือง สอดคล้องกับ Honda et al. (1999) รายงานว่าแคลลัสอ้อยที่พบจากการคัดเลือก embryogenesis ของอ้อยมีอยู่ 2 ชนิด คือ เกาะกันเป็นกลุ่มกันแน่น มีสีเหลือง และกลุ่มที่มีการเกาะตัวกันของแคลลัสอย่างหลวมๆ

สำหรับอิทธิพลของ 2, 4–D และน้ำตาลซูโครสที่ชักนำให้แคลลัสอ้อยมีการเพิ่มปริมาณพบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่มี 2, 4 – D 4 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัสพันธุ์ K 92-80 และสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่มี 2, 4 – D 4 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 15 ก./ล. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 เนื่องจาก 2, 4 – D เป็นฮอร์โมนออกซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดยอด กระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์ ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์จำนวนมากและเซลล์สามารถขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ 2, 4-D สามารถรักษาสภาพการเป็นแคลลัสและถูกทำลายโดยเซลล์พืชได้ช้ากว่าออกซินอื่น (รัตนา ขามฤทธิ์, 2550) จะเห็นว่าปริมาณ 2, 4-D และความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงต่างก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของแคลลัส โดยที่พันธุ์ที่แตกต่างกันความต้องการปริมาณฮอร์โมนในการเจริญเติบโตก็แตกต่างกันด้วย Taylor at al. (1992) พบว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D 3 มก./ล.สามารถชักนำให้อ้อย 14 สายพันธุ์เกิดแคลลัสได้ Kaur (2004) พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 4 มก./ล. kin 0.5 มก./ล. และน้ำตาลมอลโทส 30 ก./ล. สามารถทำให้อ้อยพันธุ์CoJ 83 CoJ85 และ Co 89003 เกิดแคลลัสได้สูงสุด Gurpreet et al. (2008) พบว่าปริมาณของ 2, 4-D 4 มก./ล. Kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 70 ก./ล. แคลลัสที่พบมีลักษณะฉ่ำน้ำและไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ ขณะที่ปริมาณ 2, 4-D 4 มก./ล. Kinetin 0.5 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 86.36 % แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อกระบวนการเกิดและเจริญพัฒนาของแคลลัส Khan and Khatri (2006) รายงานว่าเมื่อย้ายแคลลัสอ้อยพันธุ์ BL4 ลงในอาหารสูตรที่ไม่มี 2,4-D และมีปริมาณ 2, 4-D น้อยเพียง 0.5 มก./ล. พบว่า แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากย้ายลงอาหารได้ 7 วัน Kenia et al. (2006) พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 4.5 มก./ล. สามารถทำให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดแคลลัสได้สูงสุด

จากผลการชักนำให้แคลลัสเกิดยอดใหม่บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. และ BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเจริญเป็นยอดของแคลลัสพัฒนามาจากการขยายขนาดของแคลลัสและเริ่มเกิดสีเขียวบนแคลลัส จากนั้นยอดจะเจริญยืดยาวออก มีรายงานว่า แคลลัสที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ สามารถเจริญเป็นอวัยวะได้โดยจุดกำเนิดของอวัยวะอาจเกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือกลุ่มของเซลล์พาเรงไคมาเจริญไปเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญของอวัยวะที่แบ่งเซลล์จำนวนมาก จากการทดลองนี้พบว่า บางแคลลัสเจริญเป็นยอดเพียงอย่างเดียว บางแคลลัสมีทั้งยอดและราก ทั้งนี้การเกิดยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นกับสัดส่วนระหว่างฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสม รวมไปถึงความพร้อมในการเจริญและพัฒนาของแคลลัส

สำหรับอิทธิพลของ BA และ NAA ที่มีผลต่อการเกิดยอดของแคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 พบว่าความเข้มข้นของBA และ NAA ที่เหมาะสมคือ BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. และแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ความเข้มข้นของBA และ NAA ที่เหมาะสมคือ BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล.เนื่องจาก BA เป็นฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ ทำให้แคลลัสเกิดยอด และเจริญเติบโตเป็นต้นได้ดี ส่วน NAA เป็นฮอร์โมนออกซินที่ส่งเสริมคุณสมบัติการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก กระตุ้นการเกิดราก (สุริยันต์ ฉะอุ่ม และคณะ, 2540 อ้างถึงใน รัตนา ขามฤทธิ์, 2550) Ciiengalran and Gallo-meagiier (2006) รายงานว่าความเข้มข้นของ BA มากขึ้นในการชักนำให้เกิดต้นในอ้อยพันธุ์ CP 84 - 1198 ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่จำนวนยอดที่ได้ต่อแคลลัสลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA สูงมากเกินไป รัตนา ขามฤทธิ์ (2550) รายงานความเข้มข้นของ BA และ IBA ที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของอ้อยพันธุ์ Phil 66 – 07 คือ 1 มก./ล. และ 0.5 มก./ล. ตามลำดับ Manickavasagam et al. (2004) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสอ้อย พันธุ์ Co92061 และ Co671 ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumerfaciens* ให้เกิดยอดได้ในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA 2 มก./ล. Kinetin 1 มก./ล. และ 0.5 มก./ล. NAA Abdulla et al. (2002) รายงานว่าแคลลัสอ้อยที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม IBA 2 มก./ล. IAA 2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล. แคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสอ้อยพันธุ์ CoJ 83 CoJ 85 และ Co 89003 ให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการเติมซีโฟแทกซีม 250 และ 500 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.2 มก./ล. และ kinetin 0.2 มก./ล. (Kaur, 2008) แสดงให้เห็นว่าการเจริญเป็นต้นของแคลลัสอ้อยนั้นอาศัยปัจจัยส่งเสริมหลายทาง ความสามารถของการเกิดต้นและรากนั้นแตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์อ้อย และการกระตุ้นให้แคลลัสเกิดต้นง่ายกว่าเกิดราก การเกิดรากสามารถทำ ได้โดยการนำ ต้นไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15 °ซ เป็นเวลา

4-6 สัปดาห์ แต่ถ้านำ เอาไปเลี้ยงในอาหารที่มี 2, 4-D ไม่ว่าจะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือให้ฮอร์โมนอื่น ๆ ก็ไม่สามารถเกิดรากได้ การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและรองลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งเป็นการลดปริมาณเกลือในอาหาร และการตัดใบออก เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้กระตุ้นให้มีการเกิดราก และสามารถใช้ได้กับพืชเกือบทุกชนิด (Heinz and Mee.1969 อ้างถึงใน ปัทมา ศรีน้ำเงิน. 2546) นอกจากนี้อยู่กับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่ได้รับมาก่อนและที่มีอยู่ในเซลล์พืชเอง อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงถ้าได้รับสัดส่วนออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะเกิดราก แต่ถ้ามีสัดส่วนออกซินต่อไซโตไคนินต่ำแคลลัสจะเกิดยอด

สิ่งที่ต้องพิจารณาอีกประการคือ การการออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลลิกที่ปลดปล่อยออกมา ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเป็นพิษ ซึ่งไปยับยั้งการเจริญและการขยายขนาดของเซลล์ ดังนั้นเพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวควรมีการเปลี่ยนอาหารทุก 3-4 สัปดาห์ หรือการเติมผงถ่านในอาหารเพาะเลี้ยง การเติมผงถ่านปริมาณ 0.25 ก./ล. ในอาหารเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของราสป์เบอร์รี พบว่าสามารถลดการเกิดสีน้ำตาลในอาหารได้ 10 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีอัตราการรอดชีวิตถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Wang et al. 2005 อ้างถึงใน Thomus. 2008)

การศึกษาการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* จำเป็นต้องมีการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อไม่ให้เชื้อก่อความเสียหายแก่แคลลัสและต้นอ่อนของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งในการกำจัดเชื้อดังกล่าวมีการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น cefotaxime, cabenecillin และ timentin (สุมนทิพย์ บุนนาค, เนริสา คุณประทุม, 2540) ซึ่งในพืชต่างชนิดกัน การใช้ยาปฏิชีวนะจะใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันของชนิดเนื้อเยื่อและพืช ปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมอย่างกว้างขวางในปริมาณ 200-500 มก./ล. เนื่องจากซีโฟแทกซีมจะไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ mucopeptide ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยซีโฟแทกซีมทำหน้าที่จับกับกับเอนไซม์ transpepsidase ทำให้สายเพบทิโดไกลแคนไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ (วิลาวัลย์ เจริญวิระตระกูล, 2533; Teixeira and Fukai, 2001) จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญแคลลัสและต้นอ่อนของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 สามารถเจริญได้คือ 600 และ 400 มก./ล. ตามลำดับ และต้นอ่อนที่ระดับความเข้มข้นซีโฟแทกซีม 200 มก./ล. ในทั้งสองพันธุ์ การเติมซีโฟแทกซีมในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดต้นอ่อนของอ้อยมีผลยั้บยังการเจริญและทำให้แคลลัสและต้นอ่อนของอ้อยมีอัตราการเจริญลดลงภายในเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของซีโฟแทกซีมที่สูงขึ้น โดยความสามารถในการทนทานต่อซีโฟแทกซีมของแคลัสและต้นอ่อนของอ้อยจะแตกต่างกัน รัตนา ขามฤทธิ์ (2550) รายงานว่าแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นของซีโฟแทกซีม 500 มก./ล. โดยมี

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100 Humaru and Order (1998) ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเกิดต้นใหม่ของ *Pinus pinea* L. พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 250 มก./ล. เนื้อเยื่อยังคงความสามารถในการเจริญเติบโต ยอดมีการเจริญยืดยาวขึ้นและยังเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดต้นใหม่ อย่างไรก็ตาม การเติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปริมาณสูงสามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* แต่จะก่อให้เกิดปัญหาความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช และสามารถทำให้ต้นอ่อนพืชมีลักษณะผิดปกติ เมื่อใช้ความเข้มข้น 500 มก./ล. ขึ้นไป (Barrett et al, 1997; Gama et al, 1996) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและพันธุ์ของพืชด้วย

การศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืชถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากพลาสมิดที่ทำการส่งถ่ายยีนให้พืชนั้นมียีนเครื่องหมาย (selectable marker gene) *hpt* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยในการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ได้ดี หากเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำเกินไปอาจไม่สามารถคัดแยกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนได้ ทั้งนี้ในการส่งถ่ายยีนสู่พืชหลายชนิดมีการใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน เนื่องจากไฮโกรมัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพและไม่ทำให้พืชมีลักษณะผิดปกติ เช่น เกิดลักษณะต้นเผือก (albino) หรือทำให้ต้นพืชเป็นหมัน (Ayres and Park, 1994 อ้างถึงใน เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, 2548) จากผลการศึกษา พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เติมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 คือ 50 มก./ล. และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เติมในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 คือ 30 มก./ล. โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 0 รัตนา ขามฤทธิ์ (2550) พบว่า ระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน 50 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์Phil 66-07ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 0

การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยอาศัย *A. tumefaciens* เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิด gene silencing ต่ำ เมื่อเทียบกับการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง (Barkat et al., 1997; Shou et al., 2004) อย่างไรก็ตามการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการส่งถ่ายยีน อาทิ ขนาดของชิ้นส่วนพืช สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ปริมาณความหนาแน่นของเชื้อที่ใช้บ่มรวมกับชิ้นส่วนพืช และระยะเวลาในการบ่มชิ้นส่วนพืชกับเชื้อ ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) พบว่า เชื้อเจริญได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ช่วง stationary

phase เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการนำเชื้อมาบ่มร่วมกับชิ้นส่วนพืช คือ 12-21 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ในช่วง log phase Petri et al. (2004) พบว่าในการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* จะมีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อใช้เชื้อที่เจริญในช่วง log phase แต่ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญในช่วง stationary phase ทั้งนี้ผลที่ได้แตกต่างจากของรัตนา ขามฤทธิ์ (2550) ที่รายงานว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการนำเชื้อไปใช้ในการส่งถ่ายยีนคือ 24-32 ชั่วโมง De Bondt et al. (1994) รายงานว่าความหนาแน่นของเซลล์มีผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ที่มากเกินไป จะเกิดการสะสมของสารพิษที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งจะส่งผลต่อเนื้อเยื่อพืชได้ ส่วนความหนาแน่นของ *A. tumefaciens* ที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อย มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 (Manickavasagum et al., 2004)

จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LB 4404 (pCAMBIA 1305.1) พบว่าที่ความเข้มข้น 150 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Agrobacteirum* สายพันธุ์นี้ได้ โดยมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.027 จากการที่สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เนื่องจากซีโฟแทกซีมเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟาโลสปอริน ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดแตกและมีผลต่อการแบ่งตัวของแบคทีเรีย (แจ่มใส เพียรทอง และคณะ, 2525) ถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatics) แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocide) (ยุพา ผึ้งน้อย, 2542)

ในการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *A. tumefaciens* นั้นจำเป็นต้องหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีน โดยระยะเวลาดังกล่าวต้องเป็นระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ยีน *gus* สามารถแสดงออกได้มากที่สุด ทั้งนี้หากระยะเวลาที่บ่มเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อนานเกินไป จะทำให้เนื้อเยื่อนั้นตายหรือมีอัตราการเจริญที่ลดลง นอกจากนี้การใช้เวลานานจะทำให้เกิดปัญหาในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังการส่งถ่ายยีน Shrawat et al. (2007) ทำการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวบาร์เลย์โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 พบว่าหากบ่มเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อนานเกินกว่า 3 วัน ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนจะลดลง และทำให้เนื้อเยื่อตาย เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตมากเกินไป ทำให้เกิดปัญหาในการกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อหลังการส่งถ่ายยีน เพราะหากเชื้อมีการเจริญมากเกินไป การกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมสูง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อโดยอาจทำให้เนื้อเยื่อหยุดการเจริญหรือตายได้ ดังนั้นควรเลือกระยะเวลาในการบ่มที่น้อยที่สุดที่สามารถส่งถ่ายยีนมากที่สุด เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี GUS assay เนื่องจาก *A. tumefaciens* ที่ใช้ทดลองมี *gus* gene เป็นยีนรายงานผล ซึ่ง *gus* gene จะ

สังเคราะห์เอ็นไซม์ β-glucuronidase ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ 5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D-glucuronide (X-gluc) ในสารละลาย X-gluc ให้เป็น indolyl derivative ที่มีสีฟ้า ทำให้เนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีสีฟ้า จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ร่วมกับ *A. tumefaciens* พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 20 และ 40 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ gus gene เท่ากับ 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้บ่มขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของพืชด้วย จากการศึกษาของรัตนา ขามฤทธิ์ (2550) พบว่าอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนคือ 90 นาที เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *gus* gene เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Manickavasagum et al. (2004) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 2-4 วัน แต่ไม่ควรเกิน 4 วัน เนื่องจากเชื้อจะเจริญมากเกินไป ทำให้ยากแก่การกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อ

Acetosyringone (AS) เป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ที่พืชปลดปล่อยออกมาเมื่อเกิดบาดแผล ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของ *vir* gene ทำให้เกิดกระบวนการการส่งถ่ายยีนเพิ่มขึ้น (Godwin et al., 1991) จากการศึกษาของ AS ต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) พบว่า AS สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *gus* gene เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่แคลลัสที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว MS ที่ไม่ได้เติม AS ในขณะที่แคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* ทั้งที่เติมและไม่เติม AS มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *gus* gene เท่ากับ 100 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแคลลัสอ้อยพันธุ์ดังกล่าวมีการปลดปล่อยสาร phenolic compound ออกมาอยู่แล้ว สังเกตจากอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแคลลัสอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ Krish et al. (2003) รายงานว่าความเข้มข้นของ Acetosyringone 100 μM สามารถกระตุ้นการทำงานของ *vir* gene ในการส่งถ่าย T-DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Shrawat et al. (2007) พบว่าการเติม AS ความเข้มข้น 500 μM สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวบาร์เลย์ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ *gus* gene สูงสุดเท่ากับ 21.2 เปอร์เซ็นต์

จากการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของต้นอ่อนอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีการเติมไฮโกรมัยซิน พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยใช้ primer 35S และ NOS มีขนาด 195 และ 180 bp ตามลำดับ ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA 1305.1 ที่เป็น positive control จึงสามารถยืนยันได้ว่ามีการสอดแทรกของยีนเข้าสู่โครโมโซมพืช สอดคล้องกับมนฑิณี กมลธรรม (2545) ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนในทุเรียนโดยใช้โดยใช้ primer 35S และNOS พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 195 และ

180 bp ตามลำดับ และนาทฤดี ชำนาญพล (2546) รายงานการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน ในเสาวรสที่ทำการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) โดยใช้ primer 35S และNOS พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 195 และ180 bp ตามลำดับ Pipatpanukul et al. (2004) สามารถตรวจพบดีเอ็นเอขนาด 189 bp ในข้าวแปลงพันธุ์ RD6 โดยใช้ primer 35S