รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ประจำปีงบประมาณ 2549

เรื่อง

การเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่และการกลายพันธุ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อเพิ่มลักษณะทนเค็ม

Increase Efficiency of Embryogenesis Induction and Mutagenesis of Khao Dawk Mali 105 Enhances Salt Tolerance

ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุดิบและวิธีทดลอง	3
ผลการทดลอง	6
สรุปผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	16

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QK
495
.G74
ก124ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 78092
วัน,เดือน,ปี 20 ก.พ. 2551

.b 11929508
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก และยังเป็นอาหารหลักของประชากรกว่าครึ่งโลก พื้นที่ที่ใช้ในการเพาะปลูกข้าวส่วนใหญ่อยู่ในทวีปเอเชีย ซึ่งพื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกข้าวแต่ละสายพันธุ์นั้นจะแตกต่างกันตามสภาพภูมิศาสตร์ ทำเลที่ตั้ง ชนิดของดิน และสภาพแวดล้อมปัจจุบันมีการบริโภคข้าวเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากร และความนิยมการบริโภคข้าวที่กว้างขวางขึ้น ทำให้มีความจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้เหมาะสมต่อปริมาณและความต้องการในอนาคต ปัจจุบันข้าวสายพันธุ์ไทยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105: KDML 105) เป็นข้าวสายพันธุ์อินดิคาที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ การปลูกข้าวของคนไทยนั้นจะอาศัยธรรมชาติเป็นหลัก จึงทำให้ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่ไม่คงที่อาจมาจากสาเหตุต่างๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ สภาพภูมิประเทศ ศัตรูพืช และโรคพืชต่างๆ (ประพาส, 2531)

ในปัจจุบันปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ส่งผลกระทบต่อการเพาะปลูกข้าวเป็นอย่างมา โดยเฉพาะดินเค็มซึ่งเป็นปัญหาหลักที่ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ ไอออนที่มีอยู่จำนวนมากในดินเค็มนี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชทางสรีระวิทยา เนื่องจากปริมาณเกลือที่ละลายน้ำในปริมาณสูง มีผลทำให้พืชสามารถดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารได้น้อยลง จึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง ผลผลิตมีปริมาณและคุณภาพที่ต่ำ ในพืชที่มีความสามารถในการทนเค็มในระดับสูงจะสามารถเจริญเติบโตบนพื้นที่ดินเค็มได้ โดยมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งมีรายงานถึงกลไกในการป้องกันตัวเองของพืชหลายระบบ คือ กลไกการควบคุมความดันภายในเซลล์ (osmoregulation) โดยสะสมสารต่างๆ เช่น น้ำตาล โปรตีน และกรดอะมิโน (Hasegawa และคณะ 2000) เพื่อช่วยรักษาสภาพของเซลล์ให้สามารถทำงานได้อย่างปรกติ นอกจากความเค็มจะมีผลต่อสรีระวิทยาของพืชโดยตรงแล้ว ยังมีผลชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งจะทำลายระบบต่างๆภายในเซลล์พืช การแสดงออกสารกลุ่มฟีนอลิกที่พืชสร้างขึ้น เช่น เฟลโวนอยด์ก็มีส่วนช่วยในการลดและกำจัดอนุมูลอิสระ เพื่อให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตได้อย่างปรกติ

ได้มีการวิเคราะห์ยืนยันและผลผลิตของยีนที่มีการแสดงของการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่มีไอออนจากการแตกตัวของเกลือโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น micro array (Kawasaki และคณะ 2001, Maathuis และคณะ 2003) และพบว่ามีการแสดงออกของยีนหลายกลุ่มตอบสนองต่อความเค็มร่วมกัน

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีหลายวิธี การทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่มีโอกาสในการชักนำให้เกิดต้นกลายพันธุ์ผ่านแคลลัส เนื่องจากแคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วที่อาจมีผลทำให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์อย่างผิดปรกติและให้ลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิมที่เรียกว่า somaclonal variation ส่วนการชักนำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลายพันธุ์โดยใช้ *Agrobacterium* ซึ่งมีคุณสมบัติในการถ่ายโอนส่วนทีดีเอ็นเอ (T-DNA) เข้าไปในจีโนมพืชใบเลี้ยงคู่ การแทรกของชิ้นส่วนทีดีเอ็นเอนี้จะทำแทรกเข้าสู่จีโนมพืชแบบสุ่ม ถ้าตำแหน่งที่แทรกเข้าไปนั้นเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของดีเอ็นเอ ก็อาจจะมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ วิธีนี้ค่อนข้างมีประสิทธิภาพสูงและสามารถชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างถาวร นอกจากนี้ยังสามารถใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายโอนยีนที่สนใจเพื่อให้แสดงออกในพืชโดยแทรกยีนดังกล่าวให้อยู่ระหว่างตำแหน่ง RB และ LB ของทีดีเอ็นเอ โดยยีนที่เราสนใจนั้นจะต้องอยู่ภายในโปรโมเตอร์ ที่สามารถแสดงออกได้ในพืชได้ เช่น 35s promoter (Hoa, 2003; Ghos Biswas, 1994) จะช่วยให้สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตได้

ได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยเฉพาะข้าว (Mohanty และคณะ 2003) แต่ประสิทธิภาพการถ่ายดีเอ็นเอยังมีประสิทธิภาพต่ำ โดยเฉพาะข้าวสายพันธุ์อินดิคาค่อนข้างมีข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา เนื่องจากมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงและมีความสามารถในการงอกกลับเป็นต้นใหม่ค่อนข้างต่ำและผลผลิตไม่สม่ำเสมอ แม้ว่าปัจจุบันในประเทศไทยเราได้มีการศึกษาการงอกกลับเป็นต้นใหม่ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (เอกชัย, 2542; จันทร์ประภา, 2543) แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในการงอกกลับเป็นต้นใหม่ค่อนข้างต่ำและผลการทดลองมีความแปรปรวนสูง จึงต้องการการศึกษาพัฒนาขั้นตอนการถ่ายงอกกลับเป็นต้นใหม่ และการถ่ายโอนยีนเพิ่มเติม ในที่นี้ได้มุ่งศึกษาในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาการงอกกลับเป็นต้นใหม่เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการใช้ระบบการถ่ายโอน T-DNA โดยใช้ *Agrobacterium* แล้วจึงคัดเลือกต้นที่ให้ลักษณะทนเกลือสูง ในการทดลองนี้จะเป็นแนวทางที่ใช้ในการปรับปรุง และพัฒนาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อเพิ่มปริมาณและมูลค่าของผลผลิต รวมทั้งปรับปรุงให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคนิคการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) มาแกะเปลือกออกด้วยมือ แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วย้ายมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox®) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติมทวีน 80 (tween-80) 2-3 หยด ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่มีทวีน80 2-3 หยด ในสภาวะที่เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้ง และนำไปวางบนกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

นำเมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ไปวางไว้บนอาหาร NB (Li และคณะ 1993) ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (proline) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูต้ามีน (glutamine) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร (NI) เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญต่อการงอกกลับเป็นต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

นำแคลลัสที่ได้ไปพักไว้บนกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะมืด แล้วย้ายแคลลัสลงในอาหาร NB ที่มีโพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 3 (NRB1), 4 (NRB2), 5 (NRB3), และ 6 (NRB4) มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการเปลี่ยนทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3. การศึกษาผลของวัสดุจับยึดต่อการงอกกลับเป็นต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

นำแคลลัสที่ผ่านการพักบนกระดาษชำระแล้วเป็นเวลา 7 วัน ย้ายลงอาหาร NB ที่มีโพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 8 (NRA1), 12 (NRA2), 16 (NRA3), และ 7 (NRA4) กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการเปลี่ยนทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเกลือหรือโซเดียมคลอไรด์

นำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาวางบนอาหาร NI เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด แล้วนำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มีการเติมโซเดียม-คลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้น 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร NRP2 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศา-เซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

5. การศึกษาลักษณะการทนต่อความเค็มในต้นข้าว

นำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีข้างต้น และเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) ปริมาณ 10 กรัมต่ออาหาร 30 มิลลิลิตร เป็นวัสดุจับยึด นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำการเติมอาหารเหลว NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน นำมาวัดความยาวต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นข้าว โดยใช้ตัวอย่างต้นข้าว 5 ต้นในแต่ละชุดการทดลอง

นำต้นข้าวที่งอกกลับเป็นต้นใหม่จากการทดลองข้อที่ 4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำมาปลูกในอาหารเหลว NB ที่มีเวอร์มิคูไลท์ และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 7 วัน มาวัดความยาวต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

6. การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ LBA4404 ที่ภายในมีพลาสมิด 3 ชนิด คือ pBI121, pCambia1301 และ pBI121-GFP มาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำโคโลนีเดี่ยวในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

7. การศึกษาการถ่ายโอนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

นำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาวางบนอาหาร NI เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด นำแคลลัสที่ได้ไปแช่ในอาหาร AAM (Toriyama และ Hinata, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีสารละลายของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ภายในมีพลาสมิด pBI121, pCambia1301 และ pBI121-GFP แล้วย้ายแคลลัสไปวางบนกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวางในอาหาร NI ทิ้งไว้ในอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายลงอาหาร NI ที่มีซีโฟแทกซีม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และนำแคลลัสไปพักไว้บนกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้ว 7 วัน และนำแคลลัสส่วนหนึ่งในชุดการทดลองที่ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ภายในมี พลาสมิด pBI121 และ pCambia1301 ไปทดสอบการติดสีย้อมของ GUS โดยการดัดแปลงตามวิธีของ Jefferson และคณะ (1987) และนำแคลลัสส่วนหนึ่งในชุดการทดลองที่ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ภายในมี พลาสมิด pBI121-GFP ไปส่องในกล้องฟลูออเรสเซนต์ เพื่อดูการทำงานของโปรตีน GFP และแคลลัสที่เหลือนำไปวางบนอาหาร NRP2 ที่มีซีโฟแทกซีม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์จนถึงสัปดาห์ที่ 6

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. ผลของสารควบคุมการเจริญต่อการงอกกลับเป็นต้นใหม่

เมื่อนำแคลลัสที่ผ่านการพักไว้บนกระดาษชำระเป็นเวลา 7 วันและย้ายลงในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ IAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (NRB1, NRB2, NRB3 และ NRB4) และทำการเพาะเลี้ยงไว้ในห้องเพาะเลี้ยง เมื่อเวลาผ่านไป 1-2 สัปดาห์แคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น และเมื่อผ่านไป 3-6 สัปดาห์แคลลัสบนชิ้นที่มีจุดสีเขียวจะพัฒนาไปเป็นยอด และเมื่อนำยอดที่เกิดขึ้นย้ายลงในอาหาร NB จะได้ต้นข้าวที่มีทั้งยอดและรากที่สมบูรณ์

จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่อยู่ในอาหารสูตร NRB3 จะให้แคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นจุดสีเขียวที่สูงสุด (40.5 เปอร์เซ็นต์) และให้แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นยอดได้สูงสุดเช่นกัน (18.92 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น (NRB1, NRB2 และ NRB4) ดังตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป (Abe และ Futsuhara, 1986) โดยพบว่าแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นั้นจะสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้ดีเมื่ออยู่ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน คือ IAA และกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA (จันทร์ประภา, 2543; ประภาและพรทิพย์, 2537; สรศักดิ์, 2542; เอกภพ, 2542) และจากผลการทดลองที่ได้จะพบว่าการใช้ IAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีเขียวและการเกิดยอดที่ดีที่สุด

2. ผลของวัสดุจับยึดต่อการงอกกลับเป็นต้นใหม่

วัสดุจับยึดนั้นจะมีผลต่อการดูดซึมและการส่งถ่ายสารอาหารต่าง ๆ จากอาหารเข้าสู่แคลลัสหรือเซลล์พืช ดังนั้นความเข้มข้นของวัสดุจับยึดจึงน่าจะมีผลต่อการงอกกลับเป็นต้นใหม่ (สรศักดิ์, 2542; อารีย์, 2541; Gamborg, 2002) มีผลให้วุ้นที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันนั้นทำให้แคลลัสสามารถดูดซึมและได้รับสารอาหารแตกต่างกันออกไป จากตารางที่ 2 จะพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NRA2 จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีเขียวและการเกิดยอดได้ดีที่สุด คือ 56.67 เปอร์เซ็นต์และ 23.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจะให้ผลที่สูงกว่าอาหารสูตรอื่น (NRA1, NRA2 NRA3 และ NRA4) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของวัสดุจับยึดนั้นมีผลต่อการงอกกลับเป็นต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

78092

ตารางที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญ BA ต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสเกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์แคลลัสเกิดจุดเขียว	จำนวนแคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดเป็นต้นใหม่
NRB1	34	5	20.6	2	5.88
NRB2	33	8	24.2	4	12.12
NRB3	37	15	40.5	7	18.92
NRB4	36	5	13.9	1	2.78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A) (B) (C) (D)

รูปที่ 1 (A) แคลลัสที่ผ่านการพักตัวบนกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 7 วัน

(B) แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นจุดสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารสูตร NRA2 เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(C) แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นจุดสีเขียวและเป็นยอด เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารสูตร NRA2 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(D) แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นยอด เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตารางที่ 2 ผลของวัสดุจับยึดชนิดวุ้นและไฟต้าเจลต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสเกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์แคลลัสเกิดจุดเขียว	จำนวนแคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดเป็นต้นใหม่
NRA1	30	14	46.67	6	20.00
NRA2	30	17	56.67	7	23.33
NRA3	30	10	33.33	5	16.67
NRA4	30	7	23.33	3	10.00

3. ผลของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเกลือ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถจะทำให้เซลล์ของพืชเกิดการกลายพันธุ์ได้ ทั้งจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง (Somaclonal mutation) หรือการถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Induce mutation) (รังสฤษฎ์, 2545; Bayliss, 1980) และพบว่ามีการชักนำให้เซลล์พืชชนิดต่าง ๆ เกิดการกลายพันธุ์โดยทำให้เกิดการต้านทานต่อความเค็มเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสไว้ในอาหารที่มีเกลือหรือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จะทำให้ได้ต้นพืชที่ต้านทานต่อความเค็มได้ (Croughan และคณะ 1978; Nabors และคณะ 1980)

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 จะพบว่าในอาหารสูตร NI ที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์จะเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถที่จะชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ โดยพบว่าในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ (0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์) จะให้แคลลัสที่มีจุดสีเขียวแต่ไม่สามารพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ จึงแสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์สามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นข้าวกลายพันธุ์ได้

4. ผลของการตอบสนองและการทนต่อความเค็มของต้นข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ในสภาวะที่มีความเค็มอยู่จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด โดยพบว่าในสภาวะที่พื้นดินมีความเค็มนั้นจะส่งผลกับการสร้างผลผลิตของธัญพืชชนิดต่าง ๆ รวมทั้งข้าวด้วย (Dermiral และ Turkan, 2005; Vaidyanathan และคณะ 2003) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่ออาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นนั้น จะมีผลให้การเจริญเติบโตของต้นข้าวลดลงมากขึ้นทั้งความยาวต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4) และจากลักษณะภายนอกนั้นจะพบว่าเกิดการเน่าเสียของรากในต้นข้าวเมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

เมื่อนำต้นข้าวที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วันจะมีผลการเจริญเติบโตทั้งความยาวต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งที่ดีกว่าต้นข้าวปกติ (รูปที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

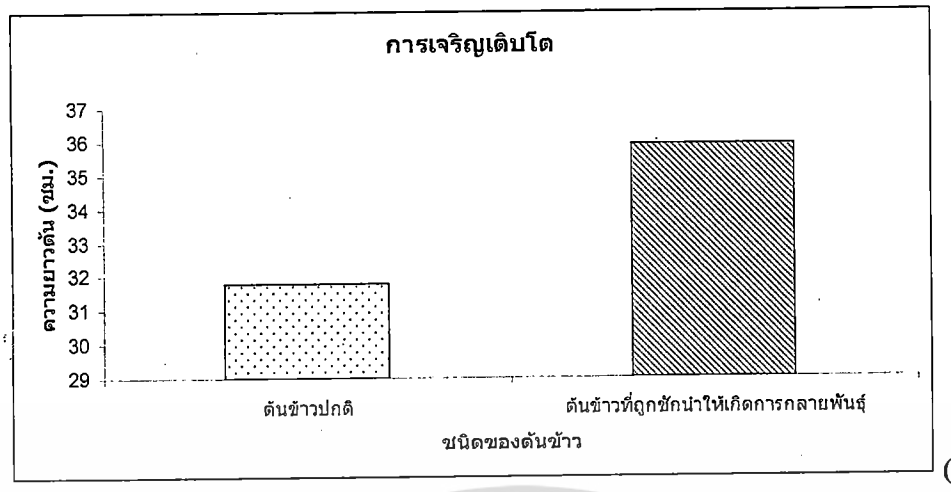
ตารางที่ 3 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (%)	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสเกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์แคลลัสเกิดจุดเขียว	จำนวนแคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่	เปอร์เซ็นต์แคลลัสเกิดเป็นต้นใหม่
0	35	23	65.71	6	17.14
0.3	35	17	48.57	5	14.29
0.4	35	16	45.71	3	8.57
0.5	35	11	31.43	2	5.71
0.6	35	4	11.43	0	0
0.7	35	2	5.71	0	0

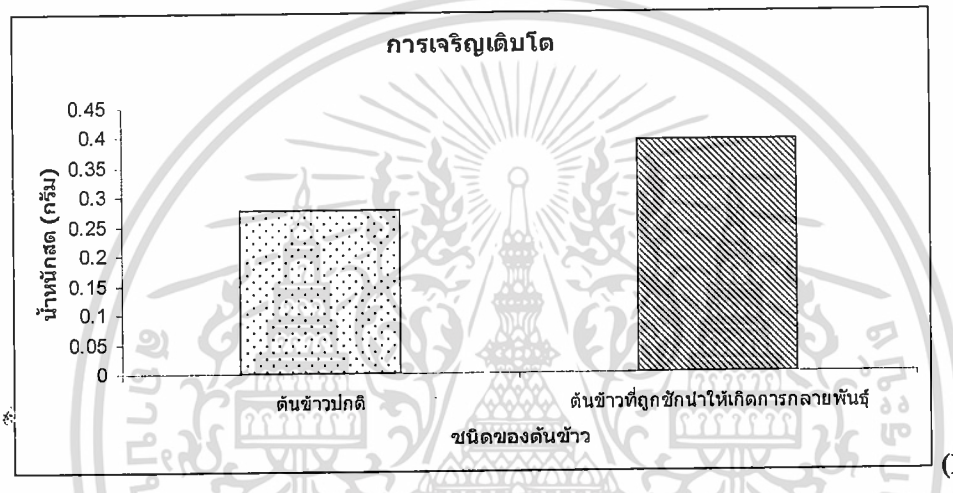
ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของต้นข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (%)	เวลา (วัน)	การเจริญเติบโต		
		ความยาวต้น (ซม.)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
0	0	31.40^{dc}	0.24950^{a}	0.02928^{a}
	7	37.20^{h}	0.43048^{f}	0.06332^{fg}
	14	40.10^{j}	0.62386^{l}	0.08512^{l}
	21	41.10^{j}	0.79842^{o}	0.11856^{n}
0.25	7	35.50^{g}	0.40570^{e}	0.05752^{de}
	14	38.60^{hi}	0.62842^{m}	0.07646^{j}
	21	38.80^{ij}	0.68272^{n}	0.09932^{m}
0.5	7	35.40^{g}	0.32550^{c}	0.05686^{de}
	14	37.30^{h}	0.61336^{l}	0.07240^{i}
	21	35.20^{fg}	0.53356^{k}	0.08054^{k}
0.75	7	33.80^{f}	0.32026^{c}	0.05464^{cd}
	14	34.80^{fg}	0.51838^{j}	0.07050^{hi}
	21	33.80^{f}	0.49972^{i}	0.07632^{j}
1	7	31.80^{e}	0.27882^{b}	0.05100^{bc}
	14	32.20^{e}	0.48758^{hi}	0.06898^{hi}
	21	33.80^{f}	0.48502^{h}	0.07088^{i}
1.25	7	31.40^{dc}	0.25996^{a}	0.05128^{bc}
	14	29.10^{bc}	0.48054^{h}	0.06248^{f}
	21	30.20^{cd}	0.45612^{g}	0.06684^{gh}
1.5	7	30.80^{de}	0.25692^{a}	0.04812^{b}
	14	28.60^{b}	0.34522^{d}	0.05982^{ef}
	21	25.00^{a}	0.32024^{c}	0.05592^{de}

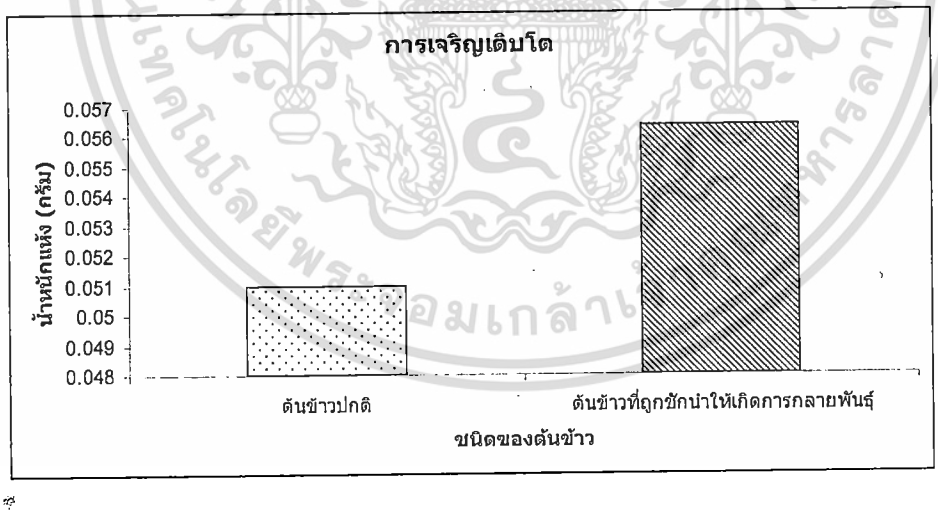
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A)



(B)



(C)

รูปที่ 2 ผลการเจริญเติบโตในอาหาร NB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ของต้นข้าวปกติและต้นข้าวที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอาหารสูตร NI ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยศึกษาจากความยาวต้น (A) น้ำหนักสด (B) และน้ำหนักแห้ง (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าวนั้นมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การใช้กระแสไฟฟ้า การใช้เครื่องยิงยีน หรือการใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ซึ่งพบว่าแต่ละวิธีนั้นจะเหมาะสมกับชนิดของพืชได้แตกต่างกันออกไป โดยการใช้อะโกรแบคทีเรียมนั้นจะมีข้อดี คือ มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูง ขั้นตอนการทดลองทำได้ง่าย เครื่องมือที่ใช้มีราคาถูกและไม่มีความซับซ้อนมาก สามารถถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการสู่รุ่นลูกหรือรุ่นหลานได้ แต่พบว่าวิธีนี้จะให้เปอร์เซ็นต์การถ่ายโอนยีนที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น (Hiei และคณะ 1997; Sallud และคณะ 2003) ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์และชนิดของพลาสมิดที่เหมาะสมและให้เปอร์เซ็นต์การถ่ายโอนยีนที่สูง

จากการทดลองโดยทำการศึกษาการถ่ายโอนยีนจากการทำงานของยีน GUS และ GFP จะพบว่าพลาสมิด pCambia1301 จะให้เปอร์เซ็นต์การถ่ายโอนยีนที่สูงกว่าพลาสมิด pBI121 เนื่องจากพลาสมิด pCambia1301 นั้นจะมียีนที่เป็น supervirulence ซึ่งจะให้ผลการถ่ายโอนยีนที่สูงและเหมาะสมกับต้นข้าวมากกว่าพลาสมิด pBI121 (Martinez-Trujillo และคณะ 2003; Sridevi และคณะ 2003) แต่จากการทดลองแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนยีน แคลลัสที่ได้จากการถ่ายโอนยีนโดยใช้พลาสมิดทั้งสองชนิดไม่สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 5 และ 6)

ตารางที่ 5 ผลการถ่ายโอนยีนในแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อศึกษาจากการทำงานของยีน GUS และ GFP โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 เป็นพาหะ

ชนิดของพลาสมิด	จำนวนแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิด GUS	เปอร์เซ็นต์การเกิด GFP
pBI121	40	7.5	-
pBI121-GFP	42	-	11.91
pCambia1301	42	16.67	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 เป็นพาหะ เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารสูตร NRP2 เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชนิดของพลาสมิด	จำนวนแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่
pBI121	48	31.25	0
pBI121-GFP	45	31.11	0
pCambia1301	45	35.56	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองจะพบว่าในอาหารสูตร NRA2 ที่มีสารควบคุมการเจริญชนิด BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งมีวัสดุจับยึดที่เป็นวุ้นความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตรจะให้ผลการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสให้เกิดการงอกกลับเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์นั้น จะทำให้ได้ต้นข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สามารถต้านทานต่อความเค็มที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อศึกษาจากการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2)

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 นั้น เมื่อทำการถ่ายโอนยีนผ่านแคลลัสข้าวจะให้ผลการถ่ายโอนยีนที่ดีที่สุดเมื่อใช้พลาสมิด pCambia1301 แต่ไม่สามารถที่จะชักนำให้แคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 5 และ 6) ดังนั้นเพื่อใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนและการแสดงออกของยีนที่ต้องการจึงต้องมีการพัฒนาขั้นตอนการถ่ายโอนยีน รวมทั้งสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและชนิดของพลาสมิดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก. 2543. การทรานส์ฟอร์มรีพอเทอร์ยีนที่สร้างโปรตีนกรีนฟลูออเรสเซนต์เข้าสู่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม. วิทยานิพนธ์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประพาส วีระแพทย์. 2531. ความรู้เรื่องข้าว. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ

ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) variety Khao Dawk Mali 105. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 28: 27-37.

รังสฤษดิ์ กาวีตั๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

สรศักดิ์ หวังสินสุจริต. 2542. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ต้านทานต่อสภาพแห้งแล้งโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อักษรสรรค์. กรุงเทพฯ. 133 หน้า.

เอกภพ นิ่มเล็ก. 2542. การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสในข้าวหอมสี่พันธุ์ และการถ่ายโอนยีนในข้าวขาวดอกมะลิ 105. โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abe, T. and Futsuhara, Y. 1986. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice. Theor. Appl. Gen. 72: 3-10.

Bayliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. Int. Rev. Cytol. 11: 113-144.

Croughan, T. P., Stararek. S. J. and Rains, D. W. 1978. Selection of NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Sci. 18: 959-963.

Dermiral, T. and Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany. 53: 247-257.

Gamborg, O. L. 2002. Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In vitro* cellular and developmental biology-Plant, 38.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ghos Biswas, G. C., Iglesias, V. A., Datta, S. K. and Potrykus, I. 1994. Transgenic Indica rice (*Oryza sativa* L.) plant obtained by curect gene transfer to protoplasts. Journal of biotechnology. 32:1-10.

Hasegwa, P. W., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Plant. Mol. Bio. 51: 463-499.

Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology. 35: 205-218.

Hoa, T. T. C., Al-Babily, S., Schaub, P., Potrykus, I. and Beyer, P. 2003. Golden Indica and Japonica rice line amenable to deregulation. Plant Physiology. 133: 161-169.

Jefferson, R. A., Kaavanagh, T. and Bevan, M. W. 1987. GUS fusions: β-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. and Bohnert, H. J. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell. 13(4): 889-905.

Li, L., Qu, R., de Kochko, A., Fauquet, C. and Beachy, R. N. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method, Plant Cell Rep. 12: 250-255.

Maathuis, F. J., Filatov, V., Herzyk, P., Krijger, G. C., Axelsen, K. B., Chen, S., Green, B. J., Li, Y., Madagan, K. L., Sanchez-Fernandez, R., Forde, B. G., Palmgren, M. G., Rea, P. A., Williams, L. E., Sanders, D. and Amtmann A. 2003. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. Plant J. 35(6): 675-92.

Martinez-Trujillo, M., Cabrera-Ponce, J. L. and Herrera-Estrella, L. 2003. Improvement of rice transformation using bombardment of scutellum-derived calli. Plant Molecular Biology reporter. 21: 429-437.

Mohanty, A., Kanthuria, H., Ferjani, A., Sakamoto, A., Mohaty, P., Murata, N. and Tyagi, A.K. 2002. Transgenic of and Indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the *code A* gene are highly tolerant to salt stress. Theoretical and Applied Genetic. 106:51-57.

Nabors, M. W., Gibbs, S. E., Bernstein, C. S. and Mein, M. E. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. Z. Pflanz. 97: 13-17.

Potrykus, I. 1990 Gene transfer to plant: a critical assessment proceeding of an EMBO workshop. Physiol. Plant. 79: 123-220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sallud, C., Meynard, D., van Boxtel, L., Gay, C., Bes, M., Brizard, J. P., Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M., Portefaix, M., Ouwerkerk, P. B. F., Rueb, S., Delseny, M. and Guiderdoni, E. 2003. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. Theor. Appl. Genet. 106: 1396-1408.

Sridevi, G., Sabapathi, N., Meena, P., Samiyappan, R., Muthukrishnan, S. and Veluthambi, K. 2003. Transgenic Indica rice variety Pusa Basmati 1 constitutively expressing a rice chitinase gene exhibits enhanced resistance to *Rhizoctonia solani*. J. Plant Biochemistry and Biotechnology. 12: 93-101.

Toriyama, K. and Hinata, K. 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. Plant Sci. 41: 179-183.

Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakvabarty, R. and Thomas, G. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)-differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Sci. 165: 1411-1418.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้