สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการงอกเป็นต้นและการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในข้าวพันธุ์ไทย

นางสาว พัชรินธร เจริญวุฒิธรรม 37054339
นางสาว เรณู เย็นเกษ 37054351
นางสาว วิไลพร เคลือบหิรัญ 37054358

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีการศึกษา 2540

ปพ.
พ523ก
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30604
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on Regeneration and Transformation by

***Agrobacerium tumefaciens* of Thai rice**

Patcharintorn Charoenwutthitham 37054339

Renoo Yenket 37054351

Vilaiporn Kleabhirun 37054358

A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่และการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ใน ข้าวพันธุ์ไทย

Study on Regeneration and Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* of Thai rice

โดย นางสาว พัชรินธร เจริญวุฒิธรรม รหัสประจำตัว 37054339

นางสาว เรณู เย็นเกษ รหัสประจำตัว 37054351

นางสาว วิไลพร เคลือบหิรัญ รหัสประจำตัว 37054358

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา Dr.Christophe Sallaud

อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

....

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

....

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

....

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม) กรรมการ

....

(Dr.Christophe Sallaud) กรรมการ

....

(อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ : การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่และการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในข้าวพันธุ์ไทย

ผู้เสนอ : นางสาว พัชรินธร เจริญวุฒิธรรม รหัส 37054339
นางสาว เรณู เย็นเกษ รหัส 37054351
นางสาว วิไลพร เคลือบหิรัญ รหัส 37054358
อาจารย์ที่ปรึกษา : Dr. Christophe Sallaud
อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ปีการศึกษา : 2540

บทคัดย่อ

การชักนำคัพภะให้เกิดเป็นแคลลัสและเพิ่มจำนวนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 สูตรอาหารที่เหมาะสมคืออาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารแข็งที่เหมาะสมสำหรับพันธุ์ชัยนาทคือ NB1 ที่ประกอบด้วยไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารแข็งที่ทำให้เกิดจุดเขียวและชักนำให้งอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 คือสูตรอาหารแข็ง RN เสริมไฟทาเจล 6 กรัมต่อลิตร แต่ในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ต้องผ่านการชักนำด้วยกรดแอบไซซิคที่ระดับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรก่อนจึงจะเหมาะที่จะนำมาชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในอาหารสูตรนี้ ต่อจากนั้นจึงนำไปชักนำให้มีระบบรากที่สมบูรณ์ขึ้นด้วยอาหารแข็ง RM ที่เสริม NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการถ่ายยีนนี้เลือกใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะในการถ่ายยีน ซึ่งต้องมีปัจจัยที่เหมาะสม คือในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60 ควรใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ค่าความดูดกลืนแสง 0.01 และอายุของแคลลัสควรอยู่ในช่วง 7-11 วัน อาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมในการถ่ายยีนสำหรับข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 คือ NB1 พันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ใช้สูตร NB1 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 สูตรอาหารแข็งที่เหมาะสมคือ NB1 ซึ่งอาหารทั้งหมดนี้ต้องประกอบด้วยอซิโตซิลิงโกน 50 ไมโครโมลาร์ ทำการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธีกัสแอสเส และคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่านยีนแล้วโดยใช้อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยเซฟโฟแทกซีม 500 มิลลิกรัมต่อลิตรและไฮโกรมัยซิน 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : Study on Regeneration and Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* of Thai rice.

Name : Miss Patcharintorn Charoenwutthitham 37054339

Miss Renoo Yenket 37054351

Miss Vilaiporn Kluabhirun 37054358

Special Project Advisor : Dr. Christophe Sallaud

Anurug Poeaim

Academic Year : 1997

Abstract

Callus induction and proliferation for Leuang Pra-tew 123 (LPT 123) and Khao Ta Hang 17 (KTH 17) should be culture on NB1 medium with 1 mg/l cytokinins. For Chainat (CN) NB1 medium with 0.5 mg/l cytokinins seem to be better for these parts. Then regenerated LPT 123 on RN medium with 6 g/l phytagel. For KTH 17, It should be better to induce by 5 mg/l abscysic acid before regeneration. Eventually they are induced root system by RM medium with 0.05 mg/l NAA. For rice transformation, *Agrobacterium tumefaciens* have been choosen. Callus will be transform under suitable condition. Using *Agrobacterium tumefaciens* suspension ,which is 0.01 OD, is suitable for transformation on at least 2 out of all varieties studied. Callus should be 7-11 days of age. Co-culture LPT 123 and *Agrobacterium tumefaciens* suspension on NB1 medium with 0.05 mM acetosylingone , NB1 medium with 1 mg/l 2,4-D 0.05 mM acetosylingone and no NAA for KTH 17, NB1 medium with 0.05 mM acetosylingone for SP 60 including CN, too. Using Gus assay to test transformation efficiency. Selected transformed callus by NB1 medium with 500 mg/l cefotaxime and 25-50 mg/l hygromycin.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ รศ. ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม กรรมการ Dr. Christophe Sallaud และอาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ในความกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม พี่ๆปริญญาโท เพื่อนๆและน้องๆที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อพิเศษภาคภาษาไทย	ก
บทคัดย่อพิเศษภาคภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
-ที่มาของ ปัญหา	1
-วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ผลงานวิจัยและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 วิธีทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	37
1 ผลของสารบางชนิดในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส	37
1.1 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส	37
1.2 ผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส	40
1.3 ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟแทกซิมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส	41
1.4 ผลของ2,4-D 3,4-D และ โพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส	47
2. การชักนำให้เกิดการงอกใหม่	50
2.1 ผลของความเครียดของน้ำที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	50
2.2 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	51
2.3 ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	56
2.4 ผลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิกที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	59
2.5 ผลของ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดระบบรากของพืชที่ผ่านการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการถ่ายยีน 64

3.1 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacians* ในการถ่ายยีน 64

3.2 ผลของอายุแคลลัสที่เหมาะสมในการถ่ายยีน 65

3.3 ผลของการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกันในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17และสุพรรณบุรี 67

3.4 ผลของการถ่ายยีนโดยใช้*Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ต่างๆ 68

3.5 ผลการคัดเลือกแคลลัสที่ทำการถ่ายยีนแล้ว 70

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 76

1 ผลของสารบางชนิดในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส 76

2. การชักนำให้เกิดการงอกใหม่ 77

3. การถ่ายยีน 77

เอกสารอ้างอิง 79

ภาคผนวก 85

ภาคผนวก ก 85

ภาคผนวก ข 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช	19
2 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	37
3 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง17	38
4 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	38
5 ผลของฮอร์โมนไสโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรปรับปรุงในข้าวพันธุ์ชัยนาท	39
6 ผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17 และชัยนาท	40
7 ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟแทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	41
8 ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟแทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17	43
9 ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟแทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60	45
10 ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	47
11 ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง17	48
12 ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี60	49
13 ผลของความเครียดของน้ำที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	50
14 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17 และชัยนาท	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่		หน้า
15	ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	56
16	ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17	57
17	ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ในอาหารแข็ง RN ที่เสริม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	58
18	ผลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิกที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	59
19	ผลของ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดระบบรากของพืชที่ผ่านการชักนำให้เกิดการงอกใหม่	60
20	ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacians* ในการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	64
21	ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacians* ในการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท	64
22	ผลการถ่ายยีนในแคลลัสอายุต่างๆกันในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17 และสุพรรณบุรี60	66
23	ผลของการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกันในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17และสุพรรณบุรี60	67
24	ผลของการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกันในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17และสุพรรณบุรี60	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แคลลัสที่เหมาะสมสำหรับทำการเพิ่มจำนวน	27
2	การเพาะเลี้ยงแคลลัสขณะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และเพิ่มจำนวน	28
3	การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่	31
4	การเพาะเลี้ยง *Agrobacterium tumefaciens* ในอาหารแข็งสูตร AB	35
5	แคลลัสที่เป็นชุดควบคุมและชุดทดลองที่ผ่านการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens*	36
6	ผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารต่างๆของพันธุ์เหลืองประทิว123	37
7	ผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารต่างๆของพันธุ์ขาวตาแห้ง17	38
8	ผลของฮอร์โมนไสโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรปรับปรุงในข้าวพันธุ์ชัยนาท	39
9	ผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารต่างๆของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17 และชัยนาท	40
10	ผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17 และชัยนาท	40
11	ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟ่แทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งเสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	42
12	ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟ่แทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งไม่เสริมไซโตไคนินในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	43
13	ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟ่แทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งไม่เสริมไซโตไคนินในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17	44
14	ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟ่แทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งเสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60	46
15	ผลของไซโตไคนิน โพรลีนและเซฟโฟ่แทกซีมในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งไม่เสริมไซโตไคนินในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60	46
16	ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123	47
17	ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง17	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่		หน้า

18 ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 — 49

19 ผลของความเครียดของน้ำที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 — 50

20 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17 และชัยนาท — 52

21 จุดเขียวของแคลลัสที่กำลังชักนำให้เกิดการงอกใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 10-12 วัน — 53

22 ให้เห็นถึงการเริ่มงอกของแคลลัสที่กำลังชักนำให้เกิดการงอกใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 15-20 วัน — 54

23 การงอกเป็นต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 30-37 วัน — 55

24 ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 — 56

25 ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 — 57

26 ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ในอาหารแข็ง RN ที่เสริม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร — 58

27 ลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิกที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ — 60

28 ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 1 เดือน — 61

29 ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 3 เดือน — 62

30 รวงข้าวที่เกิดขึ้นจากแคลลัสที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่ — 63

31 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacians* ในการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 — 64

32 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacians* ในการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท — 65

33 ผลการถ่ายยีนในแคลลัสที่มีอายุต่างๆกัน — 67

34 ผลของการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกัน ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17และสุพรรณบุรี60 — 68

35 ผลของการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกัน ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ขาวตาแห้ง17และสุพรรณบุรี60 — 70

36 แคลลัสหลังจากการทดสอบกัสแอสเสเมื่อมองด้วยตาเปล่า — 71

37 แคลลัสหลังจากการทดสอบกัสแอสเสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ — 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่		หน้า
38	แคลลัสหลังจากการทดสอบกัสแอสเสที่สามารถมองเห็นจุดสีฟ้าได้ด้วยตาเปล่า	73
39	แคลลัสขณะทำการคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว	74
40	แคลลัสที่คัดเลือกได้หลังจากผ่านการคัดเลือกแล้วเป็นเวลา 20 วัน แล้วนำมาทดสอบกัสแอสเส	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ชื่อโครงงานพิเศษ ศึกษาการงอกเป็นต้นและการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในข้าวพันธุ์ไทย

บทนำ

ที่มาของปัญหา

ปัจจุบันประชากรบนโลกมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งอาจนำมาซึ่งปัญหาด้านความต้องการข้าวซึ่งเป็นอาหารหลัก ซึ่งหมายความว่าผลผลิตข้าวต้องมีปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นในปีต่อไป ผลผลิตข้าวที่มีปริมาณต่ำอาจ มีสาเหตุ มาจากการติดเชื้อไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในหลายๆสาเหตุ โดยหวังว่าวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพจะสามารถทำให้เกิดการถ่ายยีนต้านทานโรค (resistant gene) สำหรับข้าวได้มีความพยายามที่จะพัฒนากระบวนการถ่ายยีนให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

ปัจจุบันนี้ก็สามารถเพิ่มความถี่ของการงอกเป็นต้นของข้าวสายพันธุ์จาปอนิคา (Japonica)ได้สูงดังนั้นในข้าวสายพันธุ์อินดิคา (Indica) ซึ่งก็เป็นข้าวพันธุ์ที่สำคัญพันธุ์หนึ่งเช่นกันก็ควรที่จะได้รับการพัฒนาและเพิ่มความถี่ของการงอกเป็นต้นให้ได้เช่นกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารแข็งและปัจจัยที่เหมาะสมต่อชักนำให้เกิดแคลลัส
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน
4. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ผลงานวิจัยและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

การตรวจเอกสาร

ประพาส (2531) และ อรรควุฒิ (2526) ได้กล่าวถึงข้าวไว้ว่า ข้าวเป็นพืชล้มลุก ใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า (Gramineae Family) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดชนิดหนึ่ง แบ่งข้าวได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1. Oryza sativa ปลูกกันโดยทั่วไป
2. Oryza glaberrima ปลูกเฉพาะในอาฟริกาเท่านั้น
3. ข้าวป่าซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาข้าวชนิดต่างๆพบว่าข้าวพวก Oryza sativa ยังแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ อินดิคา จาปอนิคา และจาวานิคา (Javanica) โดยยึดเอาลักษณะภายนอกของต้น เมล็ด และเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง

อินดิคา เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ต้นสูงและอ่อน มีใบกว้างสีเขียวอ่อน แตกกอมาก ให้ผลผลิตต่ำ มีการตอบสนองต่อปุ๋ยน้อย แต่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่างๆได้ง่าย ปลูกมากในประเทศเขตร้อน เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และไทย

จาปอนิคา ลักษณะเมล็ดป้อมสั้น ต้นเตี้ยและแข็ง ใบแคบสีเขียวแก่ การแตกกอปานกลาง ให้ผลผลิตสูง มีการตอบสนองต่อปุ๋ยดีมาก ปลูกในพื้นที่อบอุ่น เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา

จาวานิคา เมล็ดกว้างหนา ใบกว้างและแข็ง สีเขียวแก่ แตกกอน้อย พบในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น และเป็นข้าวที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ข้าวในกลุ่มอินดิคา มีปัญหาที่สำคัญของการปลูกข้าวคือผลผลิตต่ำ ซึ่งเกิดจากโรคและแมลงเข้าทำลาย โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัส จึงได้มีความพยายามที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานโรคขึ้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรมมีหลายวิธี เช่น การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิง การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ซึ่งมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน มีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เครื่องยิง รู้ขอบเขตที่แน่นอนของชิ้นส่วน DNA ที่ถ่าย เข้าไป ไม่จำเป็นต้องถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์ แต่พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ในข้าวพวกอินดิคา ยังไม่ประสพผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำมาก เมื่อเทียบกับข้าวจาปอนิคา หรือพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่น ๆ

สำหรับงานทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการถ่ายยีนในข้าวพวกอินดิคา โดยศึกษาถึงผลของอซิโตซิลิงโกน (acesylingone) อายุของแคลลัสที่ใช้ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลอง และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการถ่ายยีนที่เป็นประโยชน์ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วเพราะชิ้นส่วนของข้าวเกือบทุกส่วนสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ตามที่ต้องการ มีการทดลองชักนำแคลลัสจากหลายไส่วนของข้าว เช่น ลำต้น (Dun-Yi และ Krikorian , 1981 ; Wu และLi , 1970) ราก (Yatazawa และคณะ , 1967 ; Wu และ Li , 1970 ; Abe และ Futsuhara , 1985 ; Zimmy และ Lorz , 1986) อับละอองเกสร (Chu และคณะ , 1975 ; Genovesi และ Magill , 1979; Comejo-Martin และ Primo-Millo , 1981 ; อุดม และ อรดี , 2523 ; สนธิชัย และคณะ , 2528) และคัพภะ (Hartke และ Lorz , 1989 ; Vajrabhaya และคณะ , 1989 ; Boissot และคณะ , 1990 ; ประภา , 2532) ประสบผลสำเร็จทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อข้าวให้ได้ผลดียิ่งขึ้น สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวไทยได้มีพัฒนาการมาเป็นลำดับ เนื่องจากข้าวไทยเป็นข้าวชนิดอินดิคา ซึ่งมีรายงานว่ามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและาการถ่ายยีนต่ำกว่าข้าวชนิดจาปานิคา ขั้นตอนสำคัญ คือ การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส โดยมีความพยายามเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นให้สูงขึ้นมาตลอด

ประภา (2537) ในการศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรีย์ และปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการชักนำให้คัพภะข้าวหอม พันธ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้นพบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรMSที่เติม 2-4,D 2 มิลลิลิตรต่อลิตรร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซส 300 มิลลิลิตรต่อลิตร ในสภาพที่มีแสงสามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูง 96.3 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด 9.4 มิลลิเมตร แคลลัสเมื่อถูกทำให้แห้งโดยพักไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วันจึงย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าย้ายลงโดยไม่ทำให้แห้งก่อน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นมี 2 สูตรคือ MS IAA 1: BA 4 ซึ่งสามารถชักนำให้ได้แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดสูงสุด 45.8 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.9 ยอด และสูตร MS IAA 1: BA 4 และ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด 45.5 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.7 ยอด

เผดิม (2536) การทดลองเพื่อหาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว 6 พันธุ์ พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในสภาพที่ได้รับแสงจะดีกว่าในสภาพมืด สูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บาสมาติ 370 และ กข 15 ได้แก่ MS NAA 5: Kin 1 ส่วนพันธุ์นางมล S4 และประดู่แดงได้แก่ MS NAA 4: Kin 1 และพันธุปทุมธานี 60 คือ MS NAA 5: Kin 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เป็นต้นอ่อนสำหรับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และนางมล S4 ได้แก่ MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ พันธุ์ปทุมธานี 60 ใช้ MS Kin 1 ในขณะที่พันธุ์ กข 15 ใช้ MS Kin 2 ส่วนบาสมาติ 370 และประดู่แดงใช้อาหารแข็งสูตร MS Kin 3

Elumalai Sivamani และคณะ (1996) ศึกษาถึงวิธีการคัดเลือกเพื่อให้ได้ แคลลัสที่มีคุณภาพสูงจากเมล็ดข้าวพวกอินดิคาเพื่อนำไปชักนำการถ่ายยีนโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ โดยจะใช้การถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาคเข้าไปในแคลลัส แต่แคลลัสที่ใช้จะต้องมีจำนวนมากและมีคุณภาพสูง ซึ่งกลายเป็นปัญหาที่สำคัญต่อกระบวนการทรานฟอร์เมชัน จึงได้มีการศึกษาถึงวิธีการคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณภาพและมีจำนวนมากเกิดขึ้น โดยจะใช้ข้าวพันธุ์ TN 1 ในสกุล indica แกะเปลือกแล้วทำการฆ่าเชื้อในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ (commercial bleach 25 เปอร์เซ็นต์)ผสมกับสารเปียกใบ(Tween20) 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 45 นาที ล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง เลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้อาหารแข็งสูตร NBKNB บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด หลังจากทำการเปลี่ยนอาหาร 4 ครั้ง ในทุก 2 อาทิตย์ แคลลัสที่ไม่จับกันแน่นจะย้ายไปเลี้ยงในาอาหารสูตร RN เมื่อชักนำให้เกิดต้น ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลาให้แสงและไม่ให้แสงเป็น16 : 8 ชั่วโมงต่อวัน ตามลำดับ ความเข้มแสง 100 - 125 มิลลิเมตร / ตารางเมตร / วินาที PAR) ประมาณ 10 วันจะเริ่มมีรากเล็ก ๆ นำไปทำให้เป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร RN เมื่อเจริญเป็นพืชที่มีรากแล้วก็นำไปปลูกลงดินในสภาวะแวดล้อมที่ควบคุมเพื่อให้ได้เมล็ด ส่วนแคลลัสที่จำนำไปทรานส์ฟอร์เมชันจะย้ายลงในอาหารสูตร NB แล้วนำไปถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาค แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NBH 50 แคลลัสที่สามารถเจริญได้จะถูกย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร NBKNB จากการทดลองพบว่าในข้าว อินดิคา แต่ละพันธุ์ไม่สามารถใช้วิธีการเดียวกันได้ทั้งในการเพาะเลี้ยงและการชักนำให้งอกเป็นต้นใหม่สำหรับการชักนำแคลลัสและการเพิ่มจำนวนแคลลัส ทางหนึ่งที่ใช้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ ในการหาอาหารที่เหมาะสมก็คือ หาความเข้มข้นหรือชนิดของไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของข้าวแต่ละชนิด ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าเซลล์ชั้นนอกของเนื้อเยื่อแคลลัสจะเพิ่มจำนวนได้ดีบนอาหารแข็งสูตร NB แต่ไม่เพิ่มจำนวนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NBKNB เช่นเดียวกับการชักนำให้งอกเป็นต้นใหม่จะต้องมีการปรับสภาพต่าง ๆ ให้เหมาะกับข้าวแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าการทำให้เกิดการงอกเป็นต้นใหม่จะเป็นปัจจัยที่ส่งผลถึงความมีประสิทธิภาพของการถ่ายยีน

การพัฒนาไปเป็นยอด และ/หรือ ราก

ไพบูลย์ (2524) กล่าวว่าการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พาเรนไคมาไปเป็นยอด ราก ใบ หรือดอกนั้น เกิดขึ้นได้จาก 2 ขบวนการ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Organogenesis คือ การเกิดเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็น meristematic cell ซึ่งมีขนาดเล็ก แวคคิวโอลเล็กและไซโตพลาสซึมเข้มข้น มีอัตราการแบ่งตัวสูง อาจเรียกกลุ่มเซลล์เหล่านี้ว่า Meristemoids ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก (Shoot or Root Primodia) การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆเกิดอย่างเป็นอิสระ ไม่ขึ้นต่อกัน ขึ้นแต่เพียงว่าเนื้อเยื่อหรือเซลล์ได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญไปเป็นอะไร

2. Embryogenesis คือ การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่หลังผสม กล่าวคือ เซลล์จะแบ่งตัวและเจริญเป็น Proembryo Globular-shaped embryo Heart-shaped embryo Torpedo-shaped embryo จนกระทั่งเป็น embryo ซึ่งจะเจริญไปเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยปลายข้างหนึ่งของ embryo จะเจริญเป็นยอด อีกข้างเจริญเป็นราก

นอกจากนี้ยังกล่าวถึงขั้นตอนการเกิดต้น และ / หรือ รากว่า การเกิด Morphogenosis ไม่ว่าจะผ่านขบวนการ Organogenesis หรือผ่านขบวนการ Embryogenesis จะแบ่งการเจริญและพัฒนาของเซลล์ได้ 2 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ขั้นการเจริญและพัฒนาจากเซลล์หรือ เนื้อเยื่อเป็นจุดกำเนิดยอดหรือราก โดยผ่านขบวนการ Organogenesis หรือ Embryoids โดยผ่านขบวนการ Embryogenesis ในขั้นตอนนี้เซลล์หรือเนื้อเยื่อต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมีในอาหาร อุณหภูมิ แสง เป็นต้น ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ กล่าวคือ เซลล์จะมีขนาดเล็กลง แวคิวโอลเล็กไซโตพลาสซึมเข้มข้น มีการสร้างโปรตีนและ RNA มากขึ้น ขณะเดียวกันก็มีการแบ่งตัวที่เร็วมาก กลุ่มเซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดของยอด ราก หรือ Embryoids

ระยะที่ 2 ขั้นการเจริญเป็นต้น และ / หรือราก เมื่อเกิดเป็นจุดกำเนิดยอดหรือราก หรือเกิดเป็น Embryoids แล้วเมื่อได้รับอาหารและปัจจัยต่างๆที่เหมาะสม ก็จะเจริญเป็นต้น และ/หรือรากที่สมบูรณ์ได้ โดยเขายังพบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญไปเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ดังนี้

1. ลักษณะทางพันธุกรรม
2. สภาพของเนื้อเยื่อ
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีอยู่ในอาหาร
4. ชนิดของน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต
5. ส่วนประกอบของอาหาร
6. การทำให้แห้งเป็นบางส่วน หรือการทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเครียดของน้ำเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vajrahaya และคณะ (1986) ทำการศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของข้าว 2 พันธุ์ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข 23 ทดลองโดยใช้สูตรอาหาร 6 สูตรที่มีส่วนผสมของ IAA kinetin และ BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีสูตรอาหารเดิมที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรเปรียบเทียบเนื่องจากเป็นสูตรที่ได้รับการทดสอบมาก่อนหน้านี้แล้วว่าให้ผลดีในการชักนำให้เกิดต้นในข้าวทั้งพันธุ์ที่ชักนำให้เกิดต้นได้ยากและง่าย ผลการทดลองปรากฏว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดต้นได้ดีบนอาหารสูตร F ซึ่งเติมไคเนตินความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนข้าวพันธุ์ กข 23 เกิดต้นได้ดีบนอาหารสูตรที่เติม BAP 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ธิดารัตน์ (2533) ทำการศึกษาเทคนิคการชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยทำการทดลองกับข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 23 ทดลองโดยใช้อาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้น 10 สูตร แต่ละสูตรมีองค์ประกอบเป็น NAA ไคเนติน และ BAP ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ข้าวทั้ง 2 พันธุ์เกิดต้นได้ดีบนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและไคเนติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้มีรายงานว่าการเติมสารประกอบอินทรีย์บางชนิดลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดเอมบริโอจีนิกแคลลัส (Embryogenic Callus) ได้ซึ่งจะมีผลดีต่อการชักนำให้เกิดต้นในที่สุด สารเหล่านั้น ได้แก่ น้ำมะพร้าว (สุพรรณี , 2532 ; Rueb และคณะ , 1994) เคซีนไฮโดรไลเสส (ประภา และ พรทิพย์ , 2537 ; Hartke และ Lorz , 1989 ; Datta และคณะ , 1992) ไทอามีน (Zimmy และ Lorz , 1986 ; Hartke และ Lorz , 1989) และแอลโพรลีน (Ozawa และ Komamine , 1989 ; Chu และคณะ , 1975 ; Chowdhry และคณะ ,1993)

แอลโพรลีนเป็นกรดอะมิโนที่พบเฉพาะในพืชที่อยู่ในสภาวะเครียด (Stress) เนื่องจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ภาวะที่ขาดน้ำ หรือดินมีความเป็นกรดสูง เคยมีรายงานว่าแอลโพรลีนสามารถกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอจีนิซีส(Embryogenesis) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ข้าวโพดได้ (Armstrong และ Green , 1985 ; Vasil และ Vasil , 1986) ต่อมา Chowdhryและคณะ (1993) ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของแอลโพรลีน และแอลทริปโตเฟนต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนิซีส และการชักนำให้เกิดต้นของข้าวพันธุ์อินดิคา Pusa 169 เมื่อเติมแอลโพรลีน และแอลทริปโตเฟนลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัส แต่มีผลให้เอมบริโอจีนิกแคลลัสที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงขึ้นด้วย แต่กลไกการทำงานของแอลโพรลีนที่มีบทบาทในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวยังต้องมีการทดสอบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Constanceและคณะได้ศึกษาผลของแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟนในการเกิด embryogenesis callus และเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นของข้าวโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. cv. Pusa169 ซึ่งมีโปรตีนสูง (9.8 เปอร์เซ็นต์) และทนต่อโรคและแมลงปานกลาง เมล็ดจะทำการฆ่าเชื้อใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในอาหาร ที่ชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้อาหาร MS ที่มี 2,4-D 10 ไมโครโมล ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 หลังจากฆ่าเชื้อแล้วเติมแอลโพรลีนที่มีความเข้มข้น 3 6 9 12 และ 15 มิลลิโมล และแอลทริปโตเฟนที่มีความเข้มข้น 20 40 90 240 และ 480 ไมโครโมล ซึ่งผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงในที่แสงน้อย อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส แล้วจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้ลงในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้นคือ MS ที่มี IAA 2.8 ไมโครโมล ไคเนติน 23 ไมโครโมล และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บในที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง เปลี่ยนลงอาหารชนิดเดิม หลังจากนั้น 30 วัน และได้ผลว่าแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟนที่ใส่ลงในอาหารที่ชักนำให้กลายเป็นต้นให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างก็ตามการทดลองก็ได้ผลถึงปริมาณแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสคือ 12 และ 240 ไมโครโมล ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มจากอาหารที่ไม่มีการเติมแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟน

Man-Si Wang,F.J.Zapata และ D.C.Castro (1987) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจาก somatic embryogenesis ที่ได้จากเมล็ดแก่แชะดอกอ่อน ของ *Oryza perennis* ซึ่งเมล็กและดอกผ่านการฆ่าเชื้อโดยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2-3 นาทีจากนั้นแช่ในเมอร์คูรี่คลอไรด์ 10-15 นาที พร้อมทั้งคนไปด้วย สุดท้ายล้างน้ำที่ฆ่าเชื้อ 5-6 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 2,4-D มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ วุ้น0.8 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 บ่มที่ 26-27 องศาเซลเซียส ในที่มืด เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 อาทิตย์ ซึ่งผลการทดลองพบว่า ปริมาณแคลลัส ที่ได้จากเมล็ด (44 เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่าจากดอกอ่อน (62 เปอร์เซ็นต์) และลักษณะของแคลลัสพบว่ามี 2 แบบ

1. Non-embryogenic callus มีลักาณะนุ่ม เป็นfiable โปร่งแสงและมีสีเหลือง
2. Embryogenic callus มีลักาณะเป็นสีขาว เป็น compact เป็นกลุ่มก้อน

การชักนำให้เกิดต้นใช้ embryogenic callus น้ำหนัก 4-6 มิลลิกรัม เลี้ยงในอาหาร MS ที่มี IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสส500 มิลลกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ Difco Bacto agar 0.8เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.8 บ่มภายใต้แสง 3000 ลักซ์ เมื่อเจริญเป็นต้นสูง 3-4 เซนติเมตร ย้ายสู่อาหาร MS และเมื่อสูง 10-15 เซนติเมตร ย้ายลงในอาหารเหลว(Yoshida 1976)สำหรับพัฒนาระบบราก จากนั้นเลี้ยงในกระถางที่ควบคุมสภาวะตามต้องการความสามารถในการเจริญเป็นต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดและดอกอ่อน แต่ในการใช้เมล็ดแก่สะดวกกว่า เพราะสามารถเก็บได้ง่าย และเก็บได้ทั้งปีและช่อดอกหนึ่งสามารถให้เมล็ด 100-200 เมล็ด

P.J. Davies (1995) และคณะได้กล่าวถึงออกซิน (auxin) จิบเบอเลลลิน(gibberllin) ไซโตไคนิน(cytokinine) กรดแอบไซซิก (absysic acid) ไว้ดังนี้

ออกซินปรกติจะพบในรูปของกรดอินดอล-3-อซิติก (indol-3-acitic acid ,IAA) เป็นหลักในพืชทุกชนิด ซึ่ง ไอเอเอผลิตจากทริปโตเฟน หรือ อินโดล ในใบที่กำลังงอก ใบอ่อน และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาให้มีการงอก ไอเอเอจะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งไปยังรากและบางที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับท่อน้ำและมีผลต่อพืชดังนี้

1. กระตุ้นให้เซลล์มีการขยายขนาดและการเจริญของลำต้น
2. กระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวในแคมเบียม (cambium) และมีผลร่วมกับไซโคไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. ส่งเสริมให้มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ใช้ลำเลียงน้ำและอาหาร
4. กระตุ้นให้มีการเริ่มงอกรากเมื่อมีการตัดลำต้น และพัฒนาการแสดงแขนงของราก และการเปลี่ยนแปลงของรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กรดจิบเบอเลลลิกสังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อของหน่อที่กำลังงอกและคัภพะที่มีการพัฒนาเกิดขึ้น กรดจิบเบอเลลลิกจะมีการเคลื่อนย้ายผ่านท่อและท่ออาหาร และมีผลต่อพืชดังนี้

1. กรดจิบเบอเลลลิกเป็นสาเหตุให้เกิดการขยายตัวของลำต้นที่มีความสูงมากๆ โดยจะไปกระตุ้นทั้งการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์
2. ชักนำให้เมล็ดมีการงอกในบางเมล็ดที่ปรกติแล้วจะต้องมีความเย็น และแสงเพื่อชักนำให้เกิดการงอก
3. กระตุ้นให้มีการผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากโดยเฉพาะ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase)ในพืชที่มีการงอก

ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนีน (adenine) โดยจะเกิดในบริเวณปลายราก และ คัภพะที่กำลังพัฒนามีผลต่อพืชดังนี้

1. ชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขณะที่มีออกซินอยู่ด้วย และยังชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในพืชที่กำลังเป็นโรคปุ่มปมด้วย
2. ช่วยให้มีการงอกของหน่อเกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและในปุ่มปม และชักนำให้มีการแตกหน่อ

ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่มีความรู้ความเข้าใจน้อย ทำให้เรายังไม่ทราบหน้าที่และกลไกที่ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแอบไซซิค สังเคราะห์ขึ้นจากกรดเมวาโลนิคในรากแก้ว ใบแก่ โดยเฉพาะเมื่อมีความเครียดน้ำ คัภพะจะมีกรดแอบไซซิคมากเนื่องจากสามารถนำมาจากใบหรือสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ซึ่งมีผลต่อพืชดังนี้

1. ทำให้เกิดการขาดแคลนน้ำทำให้ปากใบปิด
2. ยับยั้งของการเจริญของหน่อ แต่บางทีอาจช่วยให้มีการเจริญของรากได้เล็กน้อยเนื่องจากการขาดแคลนน้ำ

นอกจากนี้ P.J. Davies ยังได้กล่าวถึงการใช้ ออกซิน และ ไซโตไคนินในการชักนำให้เกิดแคลลัสไว้ดังนี้คือ

ออกซินจะช่วยให้เซลล์มีการแบ่งตัวในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากความสัมพันธ์ของการคงตัวและคุณสมบัติการทนต่อการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ใช้กันมากคือ 2,4-D NAA การเติมออกซินลงไปอาจเพียงพอต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสปรกติจะใช้ออกซินชนิดเดียวในการชักนำ แต่บางครั้งอาจใช้มากกว่า 1 ชนิด ในการเพาะเลี้ยงพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ธัญญพืชมักใช้ออกซินสังเคราะห์ เช่น 2,4-D ซึ่งบางทีระดับที่ใช้อาจก่อให้เกิดการเป็นพิษได้ แต่ก็ต้องพิจารณาถึงผลของไซโตไคนินด้วยและยังทำการศึกษาแกนลำต้นของยาสูบว่าอัตรา ออกซินต่อไซโตไคนินยังมีผลต่อการสร้างเซลล์อีกด้วยโดยเมื่ออัตราออกซินต่อไซโตไคนินสูงจะทำให้เกิดราก แต่เมื่อ
ไซโตไคนินต่อออกซินสูงจะทำให้เกิดการงอกใหม่และเมื่อใช้อัตราเท่ากันทำให้เกิดแคลลัสได้ซึ่งปัจจุบันได้มีการปรับปรุงอัตราส่วนเหล่านี้ให้เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดหน่อและราก อย่างกว้างขวางการเพาะเลี้ยงแคลลัสในระยะแรก ๆ จะสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัดซึ่งเมื่อเลี้ยงต่อไปจะมีการพัฒนาให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะเกิดหน่อและพัฒนาไปเป็นต้นในที่สุด การเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นเวลานาน ๆมักทำให้เซลล์สูญเสียความเจริญ โดยเราจะใช้เซลล์ที่มีขนาดเล็ก ๆ ในการศึกษาความสามารถที่จะเจริญในขั้นต่อไป ซึ่งปัจจัยที่สำคัญคือ พวกสารชักนำการเจริญเติบโต สภาพความดันออสโมติกที่เหมาะสม ในพวกกรณีไม่ต้องการแสง

Rance และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงการทำให้แห้งเป็นบางส่วนที่มีผลต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยทำการทดลองกับข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ TN 1 IR72 และ IR64 เริ่มแรกนำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (Tween 20)ประมาณ 2-3 หยด นานประมาณ 45 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงในอาหารสูตร NB ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส นำไปเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 4 วันแคลลัสจะเจริญมาจากส่วนของสคิวเทลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(scutella)ที่อยู่ภายในเมล็ด ตัดเอาส่วนของแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 20 วันหลังจากเปลี่ยนอาหารไปแล้ว 4-6 ครั้งนำแคลลัสที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

นำแคลลัสไปทำให้แห้งเป็นบางส่วน โดยวิธีดังต่อไปนี้ ย้ายแคลลัสลงในจานแก้วที่มีกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 แผ่น ปิดฝาแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆกัน 0-99 ชั่วโมง ในที่สุดจะได้แคลลัสที่มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำต่างๆกัน ตั้งแต่ 10-85 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำได้มาจากอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของแคลลัสหลังผ่านการทำให้แห้งกับน้ำหนักของแคลลัสก่อนผ่านการทำให้แห้ง คูณด้วย 100

ย้ายแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้งเป็นบางส่วนแล้วเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร RN เพื่อชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ อาหารแข็งสูตร RN ก็คืออาหารแข็งสูตร NB ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 วันหลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีต้นพืชต้นเล็กๆเกิดขึ้น ย้ายต้นพืชที่เกิดขึ้นลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนใดๆ บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่มีการสูญเสียน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ (บ่มไว้นาน 3-5 ชั่วโมง) จะเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้มากกว่าแคลลัสที่ไม่มีการสูญเสียน้ำเลยถึง 3 เท่า แคลลัสที่สูญเสียน้ำไป 20 เปอร์เซ็นต์ (บ่มไว้นาน 8-10 ชั่วโมง) จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์สูงถึง 61 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสที่สูญเสียน้ำไป 40 เปอร์เซ็นต์ (บ่มไว้นาน 21-24 ชั่วโมง) จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์สูงที่สุด ส่วนแคลลัสที่สูญเสียน้ำ 70-85 เปอร์เซ็นต์ (บ่มไว้นาน 68-99 ชั่วโมง) จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ลดต่ำลงมากและบางส่วนก็ตายไป

แคลลัสของข้าวสายพันธุ์ TN 1 ที่มีการสูญเสียน้ำ 30-50 เปอร์เซ็นต์ จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์สูงถึง 86.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าแคลลัสที่ไม่มีการสูญเสียน้ำเลยถึง 2.2 เท่า ส่วนแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ IR72 และ IR64 ที่มีการสูญเสียน้ำ 30-50 เปอร์เซ็นต์ จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์สูงถึง 74.4 เปอร์เซ็นต์ และ79.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าแคลลัสที่ไม่มีการสูญเสียน้ำเลยถึง 3.95 เท่า

Tsukahara and Hirosawa (1992) ได้ศึกษาการทำแคลลัสให้แห้งเป็นบางส่วนที่มีผลต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยทำการทดลองกับข้าวพันธุ์ Sasanishiki โดยนำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดลงเลี้ยงในอาหารสูตรที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย N6 เกลืออินออแกนิกที่เติมโพรลีน 12 มิลลิโมลาร์ เคซีนไฮโดรไลเซส 0.1 กรัมต่อลิตร 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ซอร์บิทอล 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม(Gellan gum) 2 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 10 วันแคลลัสจะเจริญมาจากส่วนของสคิวเทลลา (scutella)ที่อยู่ภายในเมล็ด ตัดเอาส่วนของแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เลี้ยงในที่มืดต่ออีก 14 วันหลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้อัตราส่วนแคลลัส 1 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 7 วัน หลังจากนั้น 8 สัปดาห์กรองเซลล์แขวนลอยด้วยตาข่ายไนลอนที่มีขนาดรูประมาณ 1 มิลลิเมตร และล้างด้วยอาหารที่ไม่มี 2,4-D 3 ครั้ง จะได้แคลลัสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0-1.5 มิลลิเมตร

นำแคลลัสไปทำให้แห้งเป็นบางส่วน โดยวิธีดังต่อไปนี้ ย้ายแคลลัสลงในจานแก้วที่มีกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 แผ่น ปิดฝาแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆกัน 0-99 ชั่วโมง ในที่สุดจะได้แคลลัสที่มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำต่างๆกันตั้งแต่ 10-85 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำได้มาจากอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของแคลลัสหลังผ่านการทำให้แห้งกับน้ำหนักของแคลลัสก่อนผ่านการทำให้แห้ง คูณด้วย 100

ย้ายแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้งเป็นบางส่วนแล้วเลี้ยงในอาหาร เพื่อชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลเป็นจำนวนแคลลัสที่เจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่บ่มไว้นาน 24 ชั่วโมง จะเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์สูงถึง 47 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง จะมีปริมาณน้ำลดลง 49 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่บ่มไว้นาน 96 ชั่วโมง จะมีเปอร์เซ็นต์การเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ลดลง แคลลัสที่มีปริมาณน้ำลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

Peterson and Smith (1991) ได้ศึกษาผลของ กรดแอบไซซิค (Absisic acid) และขนาดของแคลลัสที่มีต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยทดลองกับข้าว 7 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Lemont Rico 1 Rexmont Skybonnet IR36 IR64 และTaipei 309

นำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลาย คลอรอกซ์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง นำเมล็ดลงเลี้ยงในอาหารสูตร ซึ่งประกอบด้วย MS salts MS vitamins น้ำตาลซูโครส 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอะมีน (Thiamine-HCl) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร อิโนซิทอล (I-inositol) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะกาโรส 4 กรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 2-3 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดเอาส่วนของ Embryogenic callus (Embryogenic callus มีสีขาว ลักษณะผิวเป็นปุ่มปม แต่เรียบ Nonembryogenic callus มีสีเหลืองขุ่น ผิวขรุขระและค่อนข้างเปียก) ลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มีคอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2-3 สัปดาห์ หลังจากที่แคลลัสมีอายุประมาณ 2 เดือน นำแคลลัสที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเกิด Embryogenic callus โดยทดลองกับอาหารทั้งหมด 4 สูตร คือ อาหารสูตรพื้นฐาน อาหารสูตรพื้นฐานที่เติมกรด แอบไซซิค 2.6 และ 26 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแอลทริปโตเฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ย้ายแคลลัสที่มีน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม เลี้ยงในสูตรอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงทำการบันทึกผลโดยบันทึกน้ำหนักของ Embryogenic callus และ Nonembryogenic callus

การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาผลของขนาดแคลลัส ที่มีต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสขนาด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 1 ชิ้น กับแคลลัสขนาด 10 มิลลิกรัมต่อลิตร 10 ชิ้น แคลลัสที่ได้จากากรทดลองนี้ได้มาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกรดแอบไซซิค 26 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองที่ 1

อาหารที่ใช้ประกอบด้วย MS salts MS vitamins น้ำตาลซูโครส 30 มิลลิกรัมต่อลิตรไทอะมีน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร อิโนซิทอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสส (Caseine acid hydrolysate) 3 กรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะกาโรส 4 กรัมต่อลิตร

ย้ายแคลลัสทั้ง 2 ขนาดเลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าว เพื่อชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5-6 สัปดาห์ ทำการบันทึกผล โดยบันทึกจำนวนต้นพืชที่เกิดขึ้นทั้งหมด

จากการทดลองพบว่าแคลลัสขนาด 10 มิลลิกรัมสามารถเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้มากกว่าแคลลัสที่มีขนาด 100 มิลลิกรัม ซึ่งยังหาสาเหตุที่แน่ชัดไม่ได้ อาจเกี่ยวกับสารประกอบบางอย่างที่เนื้อเยื่อปล่อยออกมา หรืออาจเกี่ยวกับบาดแผลที่เกิดจากการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ เนื้อเยื่อที่มีบาดแผลนี้จะสร้างสารประกอบบางอย่างออกมาซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชได้พบว่ากรดแอบไซซิค มีผลต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในข้าวสายพันธุ์ Lemont Rico 1 Rexmont Skybonnet IR 36 IR 64 และTaipei 309 โดยแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกรดแอบไซซิค 2.6 และ26 มิลลิกรัมต่อลิตรจะเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้มากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีแต่ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว 10 และ 2 เท่าตามลำดับ แต่กรดแอบไซซิค ไม่มีผลต่อการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชในข้าวสายพันธุ์ IR36 และ IR64

นอกจากนี้ยังพบว่า BAP และแอลทริปโตเฟนจะยับยั้งการเจริญไปเป็นต้นพืชในข้าวสายพันธุ์ Lemont Rico 1และTaipei 309 แต่ชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในข้าวสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ IR64 โดยแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม BAP และแอลทริปโตเฟนจะเจริญไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ได้มากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีแต่ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวถึง 5 เท่า

Shipins Zhans(1996)ทำการทดลองในข้าวอินดิคาสายพันธุ์ IR24, IR64, IR72 และสายพันธุ์ IR57311-95-2-3 สามารถทำให้งอกใหม่ได้จากแคลลัสอายุ 3-4 สัปดาห์โดยใช้เวลาประมาณ 6-8 สัปดาห์ ต้นข้าวจะได้รับการถ่ายยีนโดยการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ พลาสมิดนี้มียีนที่ควบคุมไฮโกรมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส (*hph*) ซึ่งมีความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซินบี และมียีนเบต้ากลูคูโรไนเดส(β-glucuronidase,*uid* A) ต้นที่งอกใหม่จะมีความต้านทานต่อไฮโกรมัยซินบี และแสดง *uid* A(GUS) gene ออกมา การงอกของต้นแม่ (R_0) เป็นไปอย่างปกติขณะที่ต้น R_0 และ R_1 พบว่าต้นที่มีความต้านทานไฮโกรมัยซินยังคงมียีน *hph* ซึ่งได้รับมาจากเมนเดเลียนแฟชั่น (Mendelian fashion) และโปรโตคอล (Protocol) ของการถ่ายยีนข้าวอินดิคาก็ได้ถูกสร้างขึ้น

Koki Yoshida(1995) ทำการทดลองพบว่าโนจิริมัยซินไบซัลไฟท์(Nojorimycin bisulfite)และ p-nitrophenyl-1-β-D-glucosidase ที่สามารถยับยั้ง เบต้ากลูคาเนส (β-glucanase) นี้สามารถยับยั้งการงอกของแคลลัสที่เป็นกลุ่มๆจากเนื้อเยื่อภายในรากพืชได้ โดยน้ำตาลจะไปยับยั้งการชักนำของ 2,4-D ส่งผลให้การขยายตัวของผนังเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้ส่งผลต่อการรับออกซิเจนของรากพืช และยับยั้งการทำงานของ คาร์บาเมททิลเซลลูเลส (Carbamethyl-cellulase) เบต้ากลูโคไซเดส (β-glucosidase) และแอลฟาอะราบิโนไซเดส(α-arabinosidase) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 โมล และ/หรือ สารละลายบัฟเฟอร์จากรากสกัด รวมไปถึงการทำงานของไกลแคนไฮโดรเลส (Glycan hydrolase) ในผนังเซลล์ที่แยกออกมาระหว่างที่เกิดแคลลัสด้วย

การถ่ายยีนในข้าว

วิชัย (2538)ได้กล่าวถึงการถ่ายยีนให้กับเซลล์พืชไว้ว่าการส่งถ่ายยีนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์พืชนั้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืชซึ่งอาจทำให้พืชนั้นแสดงลักษณะของยีนที่ต้องการได้ ต้นพืชที่มียีนจากแหล่งอื่นสอดแทรกเข้าไปอยู่ในยีโนมและแสดงลักษณะของยีนนั้นออกมาได้เรียกว่า พืชจำลองพันธุ์ (Transgenic Plant) กระบวนการส่งถ่ายยีนให้กับพืชแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการใหญ่ๆ คือ

1) การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง (Direct Gene Transfer) เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยไม่มีพาหะเป็นตัวนำ เช่น การใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG) การใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (microinjection) และการใช้เครื่องยิงอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(particle bombardment) สำหรับการใช้สารเคมี PEG และกระแสไฟฟ้านั้น เซลล์เป้าหมายที่จะรับยีนหรือดีเอ็นเอส่วนใหญ่เป็นโปรโตพลาสต์ ดังมีรายงานที่ประสบความสำเร็จของการใช้สารเคมี PEG ในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสสต์ของข้าวอินดิคา (Peng และคณะ , 1992 ; Dattaและคณะ , 1992) และข้าวจาปอนิคา (Uchimiya และคณะ , 1986 ; Zhang และ Wu 1988 ; Hayashimoto และคณะ , 1990) นอกจากนี้ PEG ยังสามารถนำมาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนของเซลล์แขวนลอยขนาดเล็กของข้าว(Lee และคณะ , 1991) ได้ด้วย สำหรับการใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าวพบว่ามีรายงานเฉพาะในข้าวจาปอนิคาเท่านั้น (Toriyama และคณะ , 1988 ; Zhang และคณะ , 1988 ; Tada และคณะ , 1990 ; Toki และคณะ , 1992) ในข้าวอินดิคายังไม่มีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ด้วยวิธีนี้ แต่มีรายงานการนถ่ายยีนเข้าสู่คัพภะของข้าวพันธุ์ IR36 โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Xu และ Li , 1994) สำหรับข้าวจาปอนิคาที่รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนใบของต้นข้าวด้วยกระแสไฟฟ้า (Dekeyser และคณะ , 1990) นอกจากนี้มีความพยายามปรับใช้เทคนิคทั้ง 2 วิธีนี้ร่วมกัน คือ ใช้สารเคมี PEG ร่วมกับการใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าว T|aipei 309 (Yang และคณะ , 1988)

2) การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ (Vector Mediated Gene Transfer) เป็นวิธีที่ใช้พาหะ(Vector) ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช พาหะที่ได้รับการพัฒนาจนประสบผลสำเร็จและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumifaciens* ที่เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่ซึ่งมี Ti plasmid เป็นพาหะส่งถ่ายยีนที่เราต้องการไปเชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอในโครโมโซมของพืช วิธีนี้ได้รับความนิยมแพร่หลายเนื่องจากสามารถถ่ายยีนให้กับหลายๆส่วนของพืช สามารถทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดคือ ได้ผลดีเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น เนื่องจากในธรรมชาติเชื้อชนิดนี้ไม่เข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Hooykaas-Van Slogteren , 1984) มีความพยายามถ่ายยีนในข้าวด้วย *A. tumefaciens* โดยการปรับปรุงวิธีต่างๆรวมทั้งสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ สภาพแวดล้อมของการถ่ายยีน มีรายงานของความสำเร็จในการถ่ายยีนข้าวโดยใช้ *A. tumifaciens* ทั้งในข้าวจาปอนิคา (Raineri และคณะ ,1990 ; Li และคณะ , 1992 ; Hiei และคณะ , 1994) และข้าวอินดิคา (Chan และคณะ , 1992 ; Chan และคณะ , 1993 ; Xu และคณะ , 1993 ;) แต่ยังอยู่ในวงจำกัด

Ming - Tsair Chan และคณะ (1992) กล่าวว่าข้าวเป็นพืชที่สำคัญและเป็นสิ่งจำเป็นจึงต้องมีการพัฒนาให้ต้านทานสิ่งแวดล้อมโดยจะอาศัยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในพืชใบเลี้ยงคู่และยังพัฒนาให้มีการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอีกด้วยแต่มีปัจจัยหลายอย่างที่แตกต่างจากพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ อายุของพืช สายพันธุ์ที่เป็นออกโทพีน และนอบพาลีนซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนนอกจากนี้ยังมี อซิโตซิลิงโกน และบาดแผลของพืชเพื่อชักนำสารฟีนอลลิก โดยทำการศึกษาพบว่า สามารถทำการถ่ายยีนได้ทั้งใน ใบ ลำต้น และรากที่มาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชักนำ คัภพะ 3-4 วัน โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกจะใช้ G418 ซึ่งให้ผลดีกว่า กาน่าไมซิน หลังจากทำการคัดเลือกแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PSC (potato suspension culture) ซึ่งถ้าเป็นเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตายไป ส่วนสายพันธุ์ที่ใช้ในการถ่ายยีนระหว่าง LBA4404 (PAL4404) กับ T-DNA มีความแตกต่างกันไม่มาก ในการทดสอบการถ่ายยีน DNA ที่ทำการถ่ายยีนจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ชิ้นส่วนของ gus gene หลังจากนั้นทำ sounthern bolt โดยจะพบว่าการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์จาปอนิกาจะสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ส่วนในสายพันธุ์อินดิคาจะถ่ายยีนได้เพียง 7.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก็แสดงว่าสามารถถ่ายยีนได้เช่นกัน

Seiichi Toki (1997) ได้มีการพัฒนาการถ่ายยีนโดยใช้แคลลัสที่มีอายุเพียง 2 เดือนโดยได้ทำการทดลองคล้ายกับ Rashid และคณะ (1996) แต่มีการปรับปรุงให้อาหารในช่วงการชักนำให้เกิดแคลลัสมีส่วนประกอบของกรดคาซามิโน (casamino acid) และโพรลีนรวมถึงในอาหารที่ใช้คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วด้วย ซึ่งทั้งหมดนี้จะทำการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสว่างที่ 30 องศาเซลเซียสยกเว้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเขาพบว่าการทดลองนี้จะทำให้ได้แคลลัสที่เจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเติมกรดคาซามิโนและโพรลีนลงในอาหารแข็งสูตร CI ของRashid และคณะ (1996) ซึ่งเขาเรียกอาหารนี้ว่า N6D อุณหภูมิและแสงสว่างก็มีผลต่อการเจริญของแคลลัสซึ่งเขาพบว่าที่ 30 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่างจะทำให้มีการชักนำและมีการเจริญของแคลลัสดีมาก ซึ่งต่างจากการค้นพบของ Hiei และคณะ (1994) และRashid และคณะ (1996) ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร N6D ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างเขาสามารถได้แคลลัสที่พร้อมที่จะนำไปใช้ในการถ่ายยีนภายในเวลา 2-3 สัปดาห์ ซึ่ง N6D ก็เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสม ต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ ผ่านการถ่ายยีนแล้วด้วย ซึ่งเขาสาสมารถคัดเลือกได้แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้วภายในเวลา 2 สัปดาห์

การถ่ายฝากยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*

สุรินทร์ (2539) ได้กล่าวถึงการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ไว้ดังนี้ *Agrobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าต้นพืชได้ในบริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumer) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้นเรียกว่า crown gall disease เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมนั้นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถคงสภาพเช่นเดิมอยู่ได้ คือเจริญเติบโตได้เร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใด แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เนื้อเยื่อดังกล่าวนี้ จะสร้างสารพวกโอปีนซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของกรดอะมิโนที่พบได้ไม่บ่อยนัก สารโอปีนที่สร้างขึ้นนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เข้าบุกรุกพืชที่พบมาก คือออกโทปีนและโนปาลีนสารโอปีนที่เซลล์พืชสร้างขึ้นนี้ จะเป็นอาหารของแบคทีเรีย *Agrobacterium* นั้นอีกต่อหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากเซลล์พืชเปลี่ยนสภาพ (transformed) ไปเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมและผลิตสารโอปีน แล้วจะไม่ต้องการเชื้อ *Agrobacterium* อีก กลไกที่ทำให้เกิดสภาพเช่นนี้พบว่ามีสาเหตุมาจาก พลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140-235 กิโลเบส ที่พบใน *Agrobacterium* จึงเรียกพลาสมิดนี้ว่าพลาสมิด Ti (Tumor inducing plasmid) เชื้อ *Agrobacterium* ที่พบพลาสมิดชนิดนี้ คือ *Agrobacterium tumefaciens* เชื้อ *Agrobacterium* อีกชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดรากบริเวณที่มีการบุกรุกของแบคทีเรีย คือ *Agrobacterium rhizogenes* ซึ่งมีพลาสมิด Ri (Root inducing plasmid)

เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens* จะมี DNA บางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายทอดเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียก DNA ส่วนนี้ว่า T (transferred) DNA

พลาสมิด Ti ที่พบมากมี 2 ชนิด คือ ชนิดออคโทปีน และ โนปาลีน ซึ่งมีส่วนประกอบดังภาพที่ 2 ดังนี้ มีส่วนของ virulence (vir) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช T-DNA ซึ่งภายในมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน เช่น nopaline synthase (nos), agroclinopine synthase (acs), octopine synthase (ocs) และ agropine synthase ส่วนอื่น ๆ คือ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล (ORI) ส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลาสมิดโดยวิธี conjugation (tra) ยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารบางชนิดเป็นแหล่งพลังงานได้ ได้แก่ arginine catabolism (arc) nopaline catabolism (noc) agroclinopine catabolism (agc) octopine catabolism (occ) และ agropine catabolism (agr) เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจึงสามารถสร้างสารโอปีนขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน *Agrobacterium* ก็สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากมียีนที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารโอปีนดังกล่าว เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไป พืชจะยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร

กลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีน virulence ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วย ยีนตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้

	A	B	G	C	D	E	
	⟶	⟶	⟶	⟵	⟶	⟶	

vir A มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุม โดยจดจำสารประกอบพวก phenolic ซึ่งผลิตจากพืช และไปกระตุ้นยีน vir G

vir G มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมเช่นเดียวกัน โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่น ๆ ในกลุ่ม

vir D จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ DNA ที่จุดขอบเขตทางขวาและซ้ายของ T-DNA คือ RB และ LB ทำให้เกิด T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) สำหรับส่งไปยังเซลล์พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

vir C เกี่ยวข้องกับการกำหนดสายพันธุ์ของแบคทีเรียและชนิดของพืชที่จะเข้าบุกรุก (host range determination) แต่ยังไม่ทราบว่ามีวิธีการอย่างไร

vir E เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับ DNA สายเดี่ยว เพื่อให้ T-DNA มีความคงตัว ในระหว่างและหลังจากที่มีการส่งถ่ายยีน

vir B ยังไม่ทราบหน้าที่

กลไกการส่งถ่ายยีนโดยรวม คล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ conjugation ของแบคทีเรีย กระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบฟีนอลิกจากพืช คือ อซิโตซิลิงโกนซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน chv ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และ vir gene ที่อยู่บนพลาสมิด Ti โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน vir D ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบ DNA สายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางขวา (RB) ไปเรื่อย ๆ ส่วน RB นี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้น DNA ที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าจะไม่มีส่วน LB การส่ง T-strand ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอนเพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม ข้อสังเกตที่น่าสนใจ คือยีนที่อยู่ใน T-DNA ทั้งหมดนั้นเป็นยีนของพืชที่อยู่ในพลาสมิดของแบคทีเรีย ยีนเหล่านี้มีโปรโมเตอร์ซึ่งเหมือนกับโปรโมเตอร์ของพืช และมีส่วนเทอร์มิเนเตอร์และตำแหน่งที่ใช้เติมเบส poly A ที่พบในยูคาริโอท ยีนเหล่านี้ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ของ *Agrobacterium* แต่แสดงออกในเซลล์ของพืชที่ได้รับ T-DNA เมื่อยีนเหล่านี้แสดงออกแล้วมีผลไปเหนี่ยวนำให้ยีนในเซลล์แบคทีเรียทำงานได้ และเป็นประโยชน์ต่อเซลล์แบคทีเรีย

ส่วนสำคัญที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จาก *Agrobacterium* ไปยังพืช คือ ส่วนของ vir gene และตำแหน่ง RB และ LB ของ T-DNA ส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีนและฮอร์โมนพืชที่อยู่ภายใน T-DNA นั้นไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่าย T-DNA แต่อย่างใด ดังนั้นการใช้พลาสมิด Ti เป็นเวคเตอร์สำหรับถ่ายฝากยีนให้กับพืชจะทำโดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและสารโอปีนด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อมีการส่ง T-DNA เข้าไปในพืช พืชก็จะได้รับยีนที่สอดใส่ไว้แทน แต่เนื่องจากพลาสมิด Ti เป็นพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 200 กิโลเบส การเตรียมพลาสมิด การตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปในพลาสมิดทำได้ยาก พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่มาก โอกาสที่จะพบตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด ๆ เพียง 1 ตำแหน่ง เป็นไปได้ยากหรือแทบจะไม่มีเลย พบว่า vir gene มีผลต่อการส่งยีนที่อยู่ระหว่าง RB และ LB ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีตำแหน่งอยู่ใกล้ หรืออยู่บนพลาสมิดโมเลกุลเดียวกันกับส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง RB และ LB นั้น การสร้างเวคเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนผ่าน *Agrobacterium* จึงมี 2 แบบคือ

1.Binary vector เวคเตอร์แบบนี้แยกเอาส่วนของ RB และ LB มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 10 กิโลเบสส่วนvir geneยังคงอยู่ในพลาสมิด Ti ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งอยู่ใน *Agrobacterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30604

ระหว่าง RB และ LB ซึ่งอยู่ในพลาสมิดเล็กนั้นประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในพืช และตำแหน่งที่ใช้สอดใส่ยีน เพื่อใส่ยีนที่ต้องการลงไป ส่วนนอกของพลาสมิดประกอบด้วยจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลในแบคทีเรีย *Agrobacterium* และ *E. coli* และยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการลงในตำแหน่งภายในขอบเขตของ T-DNA เดิมแล้ว นำมาใส่ใน *E. coli* แล้วจึงถ่ายพลาสมิดจาก *E. coli* ไปสู่ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti แต่เป็นพลาสมิดที่ไม่มีส่วนของ T-DNA เมื่อนำ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดนี้ไปบุกรุกเซลล์พืช จะมีการส่งชิ้น DNA ตั้งแต่ส่วน RB ถึง LB ซึ่งรวมเอายีนที่ต้องการ และยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืชเข้าไปในเซลล์พืช โดยการทำงานของ vir gene และยีนจากโครโมโซมของ *Agrobacterium*

2. Cointegrate vector เวคเตอร์แบบนี้ทำโดยตัดเอาส่วนของยีนที่ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนพืชและสารโอปีนบางส่วนออกไปจาก T-DNA ของพลาสมิด Ti และแทนที่ด้วย DNA ที่มาจากพลาสมิดของ *E. coli* และมีพลาสมิดขนาดเล็กอีกอันหนึ่ง ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในแบคทีเรีย ยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในพืช บริเวณที่จะสอดใส่ยีนที่ต้องการและจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E. coli* เท่านั้น เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการลงในตำแหน่งที่ใช้โคลนยีนแล้ว จึงถ่ายพลาสมิดลงใน *E. coli* และถ่ายพลาสมิดไปยัง *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti แบบที่อธิบายไว้ข้างต้น เนื่องจากพลาสมิดเล็กที่ใช้โคลนยีนนี้ ไม่มีจุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุลใน *Agrobacterium* จึงไม่สามารถจะคงอยู่อย่างอิสระได้ เนื่องจากในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti มีส่วนของ DNA จากพลาสมิดของ *E. coli* อยู่ ดังนั้นจะเกิดรีคอมบิเนชัน ทำให้พลาสมิดเล็กที่ใส่เข้าไปอยู่ภายในขอบเขตของ T-DNA ทั้งหมด เมื่อนำ *Agrobacterium* นี้ไปบุกรุกเซลล์พืช *Agrobacterium* จะส่งยีนทั้งหมดที่อยู่ภายใน T-DNA ดังกล่าวเข้าไปในเซลล์พืช

การถ่ายพลาสมิดขนาดเล็กส่วนที่ใช้โคลนยีนจาก *E. coli* ไปยัง *Agrobacterium* ทำโดยผสมแบคทีเรีย *E. coli* และ *Agrobacterium* แต่เนื่องจากพลาสมิดที่ใช้โคลนยีนใน *E. coli* ดังกล่าวเป็นแบบ non conjugative ไม่สามารถส่งถ่ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งโดยวิธี conjugation ได้ จึงต้องมีแบคทีเรีย *E. coli* อีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีพลาสมิดแบบ conjugative อยู่มาช่วย โดยวิธีผสม 3 พ่อแม่ (triparental mating) *E. coli* ที่มีพลาสมิดผู้ช่วย (parent II) จะส่งพลาสมิดผู้ช่วยเข้าไปในเซลล์ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิดที่โคลนยีนไว้ (parent I) ทำให้ *E. coli* เซลล์นั้นมีคุณสมบัติที่จะส่งถ่ายพลาสมิดในเซลล์ไปยัง *Agrobacterium* (parent III) ได้ แล้วจึงคัดเลือกโดยนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เพื่อคัดเลือกเซลล์ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิดหรือมียีนที่ต้องการถ่ายให้กับพืชได้ นอกจากนี้สุรินทร์ (2539) ยังได้กล่าวถึงยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืชไว้ดังนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) มีข้อแตกต่างกันคือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้คัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนที่ถ่ายฝากลงไปได้ง่าย ๆ เพื่อตรวจสอบผลสำเร็จของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และแสดงออกได้มากน้อยเพียงใด ในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อส่วนใด ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืชนั้น อาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบแล้วว่าทำงานได้ตลอดเวลาและในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะต่ออยู่กับส่วนของ DNA ที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์ ตัวอย่างยีนที่ใช้มากแสดงไว้ในตารางที่ 1

<u>ตารางที่ 1</u> ตัวอย่างยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

ตัวอย่างยีน	เอนไซม์ที่สร้างได้	ลักษณะที่แสดงออก
ยีนเครื่องหมาย		
hpt	hygromycin phosphotransferase	ต้านทานไฮโกรไมซิน
dhfr	dihydrofolate reductase	ต้านทาน methotrexate
CAT	chloramphenical acetyltransferase	ต้านทานคลอแรมเฟนิคอล
NPT II	neomycin phosphotransferase	ต้านทานกานามัยซิน
aroA	5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase	ต้านทาน glyphosate
ยีนรายงานผล		
CAT	chloramphenical acetyltransferase	
GUS	beta-glucuronidase	
nos	nopaline synthase	
luc	luciferase	
β-gal	beta-galactosidase	

โปรโมเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีนในพืชที่ใช้กันมาก คือ โปรโมเตอร์จากยีน nopaline synthase (nos promoter) ซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti และ โปรโมเตอร์จากไวรัสของกระหล่ำ cauliflower mosaic virus (CaMV35S promoter) หรือโปรโมเตอร์ที่มาจากพืชที่ต้องการทดสอบ

cauliflower mosaic virus มีจีโนมเป็น DNA วงแหวนเกลียวคู่ แต่ต่อกันไม่สนิท มีช่องว่างและมีปลายเป็น DNA สายเดี่ยวยื่นออกมา 3 จุด ลำดับเบสของ DNA บริเวณที่เป็นช่องแสดงไว้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 13 เมื่อ DNA ของไวรัสเข้าสู่เซลล์พืช จะมีการลอกรหัสได้ mRNA 2 ขนาด คือ สายยาวครอบคลุมทั้งจีโนมของไวรัสมีขนาด 35S และ mRNA สายสั้นมีขนาด 19S กำหนดการสร้างโพลีเพพไทด์ไม่น้อยกว่า 6 ชนิด (I, II, III, IV, V, VI) ปัจจุบันพบถึง 8 ชนิด โปรโมเตอร์ของ mRNA ขนาด 35S เป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพ และแสดงออกได้ในเซลล์พืชทุกประเภท จึงเป็นโปรโมเตอร์ที่นำมาใช้กันมากในการถ่ายฝากยีนในพืชเพื่อให้มีการแสดงออกของยีน ข้อควรคำนึงในการใช้เวคเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนในพืช คือ ยีนที่จะถ่ายเข้าไปต้องควบคุมโดยโปรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ในเซลล์ของพืช เวคเตอร์ที่ใช้นิยมใช้พลาสมิดที่มีส่วนของ DNA ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E. coli* อยู่ด้วย เพื่อใช้เพิ่มปริมาณ การใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายฝากยีน เวคเตอร์ที่ใช้ต้องมีส่วนของ RB และ LB ของ T-DNA หรือมีส่วนที่เหมือนกับส่วนที่ใส่ไว้ในพลาสมิด Ti ของ *Agrobacterium* (สุรินทร์ 2536)

Hiei และ คณะ (1994) ได้ทำการทดลองถ่ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวพวกจาปอนิคา 3 สายพันธุ์ คือ Tsukinohikari Asanohikari และ Koshihikari โดยศึกษาถึงผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวคเตอร์ ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช คือการเลี้ยงในอาหารที่มีอซิโตซิลิงโกนที่อุณหภูมิประมาณ 22 องศาเซลเซียส ถึง 28 องศาเซลเซียส หากเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอซิโตซิลิงโกนหรือเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงดังกล่าว จะทำให้การถ่ายยีนไม่ประสพผลสำเร็จ จากการเปรียบเทียบชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีน (ปลายยอด รากของต้นอ่อน สคิวเทลลาคัพภะที่ยังไม่เจริญเต็มที่ แคลลัสที่เจริญมาจากรากอ่อน แคลลัสที่เจริญมาจากสคิวเทลลา เซลล์แขวนลอยที่ชักนำมาจากสคิวเทลลา) โดยดูจากการแสดงออกของยีน GUS พบว่าแคลลัสที่เจริญมาจากสคิวเทลลามีการแสดงออกของยีน GUS มากกว่าเนื้อเยื่ออื่น ๆ แสดงว่าการถ่ายยีนไปที่แคลลัสนี้ทำได้ง่ายกว่าการถ่ายยีนไปยังส่วนอื่น ๆ แคลลัสที่เจริญมาจากสคิวเทลลาจึงเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้ในการถ่ายยีนต่อไป ปัจจัยสุดท้ายที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน คือ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และเวคเตอร์ที่ใช้ โดยทั่วไป *Agrobacterium* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สายพันธุ์ธรรมดา (ordinary strain) เช่น LBA4404 และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการบุกรุกพืช (super virulent strain) เช่น EHA101 นอกจากนี้เวคเตอร์ที่ใช้ยังแบ่งเป็น binary เวคเตอร์ เช่น pIG121Hm ซึ่งพัฒนามาจาก pBIN19 และ super binary เวคเตอร์ เช่น pTOK233 ซึ่งพัฒนามาจาก pTOK162 จากการทดลองพบว่าการถ่ายยีนในข้าว Tsukinohikari และ Koshihikari โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404(pTOK223) จะมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีกว่าการใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404(pIG121Hm) และ EHA101(pIG121Hm) ส่วนสายพันธุ์ EHA101(pTOK223) นั้นจะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chan และ คณะ (1992) ได้ทำการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวพวกอินดิคา สายพันธุ์ Taichung Native 1 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการถ่ายยีน และผลของเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่ง (PSC) ในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยทำการถ่ายยีนไปที่ใบ ลำต้น และรากของต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุประมาณ 3-4 วัน และคัดเลือกแคลลัสที่มีการเปลี่ยนสภาพ (transformed callus) โดยเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ G418 พบว่ามีเพียงแคลลัสที่เจริญมาจากรากที่เลี้ยงในอาหารที่มี PSC เท่านั้นที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะG418 ส่วนแคลลัสอื่นๆเป็นแคลลัสที่ไม่สามารถเปลี่ยนสภาพ (untransformed callus) ซึ่งไม่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ G418 ซึ่งแคลลัสพวกนี้จะตายเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ G418 นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อแล้ว อายุของชิ้นส่วนก็มีความสำคัญเช่นกัน พบว่าต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุประมาณ 3-4 วัน เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการถ่ายฝากยีน สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวคเตอร์ มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีน จากการทดลองถ่ายฝากยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ที่เกิด mutation บริเวณยีน vir หรือ *Agrobacterium* ที่ไม่มีส่วนของ T-DNA ไปที่รากของต้นอ่อน พบว่าไม่มีแคลลัสที่มีการเปลี่ยนสภาพเกิดขึ้นเลย จึงเป็นการยืนยันว่ายีน vir และส่วนของ T-DNA มีความสำคัญมากต่อการถ่ายยีน จากการศึกษาเกี่ยวกับเวคเตอร์ พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ที่มีเวคเตอร์แบบ cointegrate เช่น C58C1(pGV2260 : : NG1) จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าเมื่อใช้ *Agrobacterium* ที่มีเวคเตอร์แบบ binary เช่น pBI121 การเติมสารประกอบฟีนอลิก เช่น อะซิโตซิลิงโกน ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง จะไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน vir เป็นผลให้ไปเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน การเติม PSC ลงไปในอาหารจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนเช่นกัน เนื่องจากใน PSC มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิกสูง แต่ PSC ไม่มีผลใด ๆ กับรากที่มีอายุมากกว่า 3-4 วัน

Li และ คณะ (1992) ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *gusA* โดยทำการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ต่าง ๆ ไปที่ยอด ราก และเมล็ด ที่ได้มาจากต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุ 4 วันซึ่งเจริญมาจากเมล็ดหรือคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ตรวจวัดการแสดงออกของ GUS โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีฟ้าขึ้นที่ชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชที่ถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ At563 (มี pKIWI105 ซึ่งเป็นเวคเตอร์แบบ binary แต่ไม่มีพลาสมิด Ti) สายพันธุ์ At643(มี pBIN19 ซึ่งเป็นเวคเตอร์แบบ binary แต่ไม่มียีน *gusA*) จะไม่มีการแสดงออกของ GUS หรือไม่มีจุดสีฟ้าเกิดขึ้นเลย การแสดงออกของ GUS ในชิ้นส่วนที่ได้จากต้นอ่อนที่มาจากเมล็ดไม่มีความแตกต่างจากชิ้นส่วนที่ได้จากต้นอ่อนที่มาจากคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่และการเตรียมต้นอ่อนจากเมล็ดนั้นทำได้สะดวกกว่าการเตรียมต้นอ่อนจากคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองพบว่า 2,4-D ที่มีในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงต้นอ่อน (ระยะที่เมล็ดกำลังจะงอก) จะมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ GUS แต่การเติม 2,4-D 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับชิ้นส่วนพืชจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของ GUS จากการทดลองถ่ายฝากยีนในข้าว 3 พวก คืออินดิคา จาปอนิคาและกลาเบอริมารวมทั้งสิ้น 21 สายพันธุ์ พบว่าข้าวอินดิคาจะมีการแสดงออกของ GUS มากที่สุด ซึ่งมากกว่าข้าวจาปอนิคาและกลาเบอริมาถึง 2-3 เท่า ข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti ชนิดอะโกรปีน จะมีการแสดงออกของ GUS (เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีฟ้า) สูงถึง 32 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti ชนิดนอพพาลีน และออกโทปีน ซึ่งมีการแสดงออกเพียง 16 เปอร์เซ็นต์ และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชิ้นส่วนพืชที่มีการถ่ายยีนโดยใช้ pBIN19 เป็นเวคเตอร์ จะมีการแสดงออกของ GUS มากกว่าเมื่อใช้ pEND4K เป็นเวคเตอร์

เครื่องหมายที่ใช้คัดเลือก (Selectable marker)และโปรโมเตอร์ (Promoter)สำหรับการถ่ายยีนข้าว

Dekeyser และคณะ (1989)กล่าวถึงการศึกษาด้านการเพาะเลี้ยงและการถ่ายยีนที่ผ่านมาได้มีการทดลองใช้สารคัดเลือก (selective agent) และยีนที่ต้านทานต่อสารคัดเลือกเหล่านั้นเป็นจำนวนมาก สารคัดเลือกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายก็คือกานามัยซิน G418 และไฮโกรมัยซินซึ่งล้วนแต่เป็นสารในกลุ่ม อมิโนไกลโคซายด์ แอนติไบโอติกที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน(translation) ของเซลล์ สารเหล่านี้สามารถทำให้เสียคุณสมบัติได้ด้วยปฏิกิริยา Phospholylation โดยใช้ Tn5 neomycin phospho-transferase II (*npt-II*) gene หรือ Hygromycin B resistance gene ที่ได้จาก *Escherichia coli* สารคัดเลือกอื่นๆ เช่น บลีโอมัยซิน(Bleomycin) เมธโททรีเซน (Methotrexate) และ ฟอสฟีโนทริซิน (Phosphinothricin) ไม่เป็นที่นิยมใช้สาร บลีโอมัยซิน ทำให้เกิดการแตกหักของเส้นดีเอนเอในเซลล์ยูคารีโอททั่วไป ทำให้ บลีโอมัยซิน เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดร้ายแรง ส่วน เมธโททรีเซน มีฤทธิ์จับกับ catalytic site ของเอนไซม์ Dihydrofolate reductase ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถสังเคราะห์ไทมิดีน (thymidine) และทำให้เซลล์ตายในเวลาต่อมา ส่วน ฟอสฟีโนทริซิน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูตามีนซินทีเตส(GS) ในกระบวนการสังเคราะห์กลูตามีนในสิ่งมีชีวิต เป็นสาเหตุให้เกิดการสะสมแอมโมเนียภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาชนิดของโปรโมเตอร์และเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกให้เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกแคลลัสข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน โดยทำการทดลองกับโปรโมเตอร์ 6 ชนิดที่เชื่อมต่อกับยีน *npy-II* ในจำนวนนี้มีโปรโมเตอร์ 1′ transcript 2′ transcript ของ ออกโทปีน T_R-DNA ด้วย จาการทดลองพบว่าโปรโมเตอร์ 2′ transcript ของ ออกโทปีน T_R-DNA มีประสิทธิภาพมากกว่าโปรโมเตอร์ CAMV35S 3-4 เท่า และมีประสิทธิภาพมากกว่าโปรโมเตอร์ nos และโปรโมเตอร์ 1′ transcript ของออกโทปีน T R-DNA 10 เท่า นอกจากนี้การทดลองยังชี้ให้เห็นว่าการคงเจริญเติบโตของแคลลัสข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความไวต่อสารคัดเลือก เมธโทททรีเซน ฟอสฟีโนทรีซิน และ บลีโอมัยซิน ที่ความเข้มข้นต่ำ แต่มีความต้านทานต่อสาร G418 และ ไฮโกรมัยซิน ที่ความเข้มข้นปานกลาง สำหรับ กาน่ามัยซิน ที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวได้เพียงส่วนน้อยเท่านั้น สรุปได้ว่าสารคัดเลือกที่สมควรใช้คือ บลีโอมัยซิน ซึ่งจะสามารถแยกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนกับเซลล์ปกติได้ชัดเจนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือจำนวนชุดของยีน (Copy Number) พบว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนและถ้าพบจำนวนชุดของยีนหลายชุดมีความต้านทานต่อสารคัดเลือกได้ดีกว่ากรณีที่พบชุดของยีนเพียงชุดเดียวโดยเฉพาะในกรณีที่ยีนนั้นมีระดับการแสดงออกต่ำ จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern blot พบว่าในกรณีที่มีชุดของยีนเพียงชุดเดียวจะมีความผิดปกติเกิดขึ้นบนชิ้นดีเอ็นเอเสมอเช่น มีการขาดหายไปของยีน *npt-II* มีรายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของยีนที่พบหรือเมื่อมีการถ่ายยีนนั้นๆ ให้กับพืชโดยตรง Potrykus (1985) พบว่าพลาสมิดที่มียีนอยู่ 2 ชนิด เมื่อทำการส่งถ่ายพลาสมิดนั้นเข้าสู่พืชจะเกิดการสูญเสีย Non selected gene ไปประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวพันธุ์ไทย

ได้แก่ สายพันธุ์เหลืองประทิว 123(LPT123) สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17(KTH17) สายพันธุ์ชัยนาท(CN) และสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60(SP60)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร NB

2.2 สารเคมีใช้ฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween - 20)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4 - D NAA ไคเนติน BAP กรดแอบไซซิก (ABA) และกรดจิบเบอเลลลิก

2.4 กรดอะมิโน ได้แก่ แอลโพรลีน เคซีนไฮโดรไลเสส แอลทริปโตเฟน

2.5 ไมโออินโนซิทอล (myo - inosital)

2.6 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 90 เปอร์เซ็นต์

2.7 น้ำกลั่น

3.ภาชนะเครื่องแก้ว

3.1 บีกเกอร์

3.2 ขวดรูปชมพู่

3.3 ปิเปต

3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.5 จานแก้ว

3.6 แท่งแก้วคน

4. เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร

4.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด

4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบ หยาบ

4.3 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง

4.4 หม้อนึ่งความดัน

5. มีดผ่าตัด

6. ปากคีบ

7. จุกยางชนิดทนความร้อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. อะลูมิเนียมฟอยล์
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. เครื่องเขย่า
11. เครื่องอุ่นอาหาร
12. เตาไมโครเวฟ
13. กระดาษกรอง Whatman
14. พาราฟิล์ม
15. ตู้ปลอดเชื้อ
16. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
17. กล้องสเตอริโอ
18. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ภาพ
19. ตู้อบ
20. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการทดลอง

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

1.1 การศึกษาผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

1.1.1 แกะเปลือกเมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท

1.1.2 ใส่เมล็ดข้าว 50 เมล็ดลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาณ 50 มิลลิลิตรเขย่าด้วยมือนาน 2 นาที

1.1.3 เทแอลกอฮอล์ทิ้งแล้วฟอกต่อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารเปียกใบ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 คลอมิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเหมาะสมโดยดูจากการเคลื่อนตัวของเมล็ดข้าวให้สัมผัสกับสารละลายคลอรอกซ์ทั่วถึงกันเป็นเวลานาน 30 นาที

1.1.4 เทสารละลายคลอรอกซ์ออก ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง แต่ละครั้งใช้น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

1.1.5 คีบเมล็ดออกจากฟลาสก์ อย่าให้เมล็ดสัมผัสกับปากฟลาสก์ วางเมล็ดบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับน้ำบางส่วนที่ติดมากับเมล็ด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

1.1.6 คีบเมล็ดวางบนอาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 0 0.5 1 และ 2 จานละ 20 เมล็ด พันพาราฟิล์มรอบจาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.7 เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-11 วัน จะพบว่ามีแคลลัสงอกออกมาจากเมล็ดข้าว

1.1.8 เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 10-15 วัน และทำการเพิ่มปริมาณของแคลลัสเมื่อแคลลัสนั้นสามารถแบ่งแยกได้โดยง่าย (friable) โดยแบ่งให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร

1.1.9 ตรวจนับจำนวนแคลลัสที่ได้

1.10 ศึกษาผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

1.2.1 แกะเปลือกเมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60

1.2.2 เหมือนข้อ 1.1.2-1.1.5

1.2.3 คีบเมล็ดวางบนอาหารแข็งสูตรต่างๆจานละ 20 เมล็ดพันพาราฟิล์มรอบจานดังนี้

- อาหารสูตร NB1 เสริมด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและNAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารสูตร NB1 เสริมด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและNAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารสูตร NB1 เสริมด้วย 2,4-D 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและNAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารสูตร NB1 เสริมด้วย 2,4-D 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและNAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารสูตร NB1 เสริมด้วย 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและNAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารสูตร NB1 เสริมด้วย 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและNAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.4 เหมือนข้อ 1.1.7-1.1.9

1.5 ผลของไซโตไคนิน โพรลีน และเซโฟแทกซิม ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

1.3.6 แกะเปลือกเมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60

1.3.2 เหมือนข้อ 1.1.2-1.1.5

1.3.3 คีบเมล็ดวางบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ จานละ 20 เมล็ดและพันพาราฟิล์มรอบจานดังนี้

-สายพันธุ์เหลืองประทิว 123

- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอลโพรลีน 0 0.5 และ2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอลโพรลีน 0.5+Cef 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยแอลโพรลีน 0 0.5 และ2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอลโพรลีน 0.5+Cef 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 1 แคลลัสที่เหมาะสมสำหรับทำการเพิ่มจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงแคลลัสขณะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่และเพิ่มจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยแอลโพรลีน 0 1.4 2.8 และ4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 0+Cef 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอลโพรลีน 0+Cef 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

-สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอลโพรลีน 0 0.15 0.3 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและโพรลีน 0.5+Cef 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยโพรลีน 0 0.15 0.3 และ0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและโพรลีน 0.5+Cef 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3.4 เหมือนข้อ 1.1.7-1.1.9

1.4 ผลของ2,4-D 3,4-D และโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

1.4.5 แกะเปลือกเมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60

1.4.2 เหมือนข้อ 1.1.2-1.1.5

1.4.3คีบเมล็ดวางบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ จานละ 20 เมล็ดและพันพาราฟิล์มรอบจานดังนี้

- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วย 3,4-D แทน 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยโพรลีน 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.4 เหมือนข้อ 1.1.7-1.1.9

2.<u>การชักนำให้เกิดการงอกใหม่</u>

2.1. การศึกษาผลของความเครียดของน้ำที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.1.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

2.1.2. ทำการเพาะเลี้ยงดังข้อ 1.1.1-1.1.8

2.1.3. หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 40-60 วันจะนำแคลลัสไปชักนำให้การงอกใหม่

2.1.4. นำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในขวดเบอร์ ที่มีอาหารชักนำให้เกิดการงอกใหม่ (Regeneration medium, RN) ที่ประกอบด้วยไฟทาเจล 3 และ 6 กรัมต่อลิตร

2.1.5. เพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่าง

2.1.6. ตรวจวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน และ 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2. การศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.2.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17

2.2.2. ทำการเพาะเลี้ยงดังข้อ 1.1.1-1.1.8

2.2.3. หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 40-60 วันแคลลัสจะนำแคลลัสไปชักนำให้การงอกใหม่

2.2.4. นำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในขวดที่มีอาหารชักนำให้เกิดการงอกใหม่ (Regeneration medium, RN)

2.2.5. เพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง

2.2.6. ตรวจวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน และ 60 วัน

2.3. การศึกษาผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.3.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17

2.3.2. ทำการเพาะเลี้ยงดังข้อ 1.1.1-1.1.8

2.3.3. หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 40-60 วันจะย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำการเกิดแคลลัสอีกชนิดหนึ่งซึ่งจะเสริมด้วย

2,4-D	0.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
NAA	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
ไฟทาเจล	6.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
กรดแอบไซซิค	5.0	มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้ 7 วัน

2.3.4. เมื่อครบ 7 วันจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.3.5.สังเกตการงอกใหม่และตรวจวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 30 วัน และ 60 วัน

2.4 การศึกษาผลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.4.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

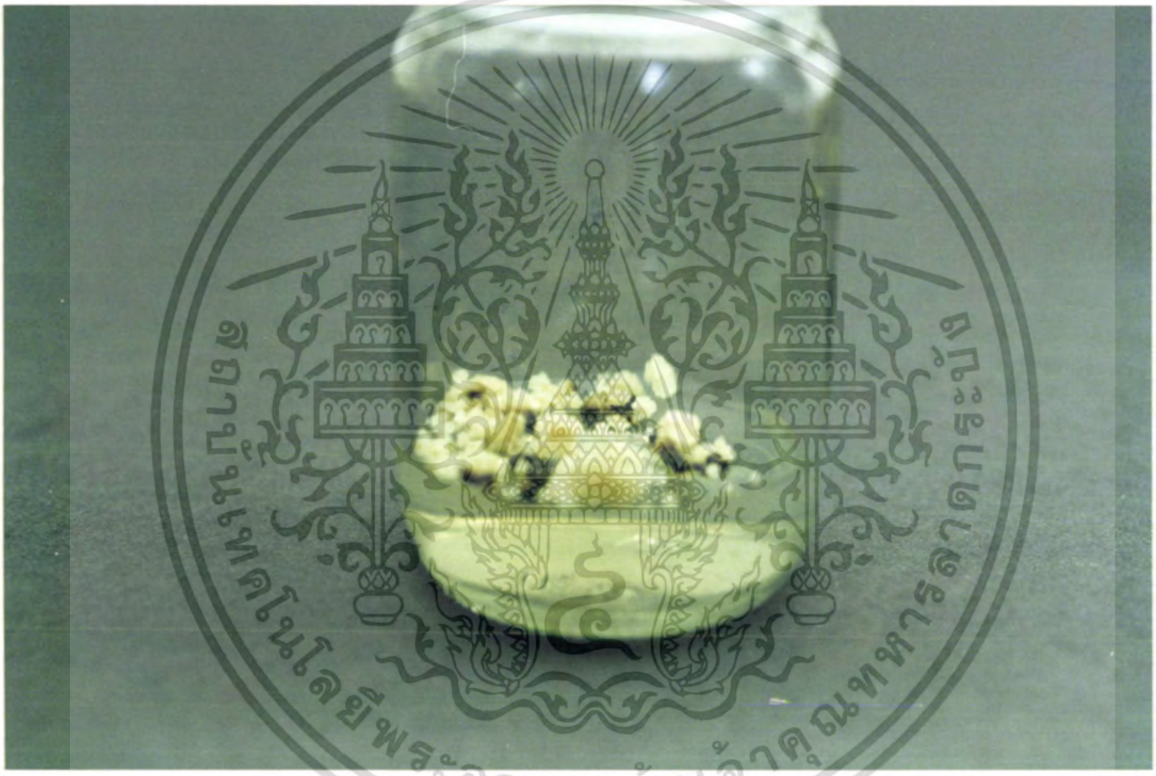
2.4.2. ทำการเพาะเลี้ยงดังข้อ 1.1.1-1.1.8

2.4.3. หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 40-60 วันจะย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำการงอกใหม่ที่เสริมด้วย

2,4-D	0.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
ฮอร์โมนไซโตไคนิน	0.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
ไฟทาเจล	6.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (GA)	4.0	มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.4. สังเกตการงอกใหม่และตรวจวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 30 วัน และ 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5. การศึกษาผลของ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดระบบรากของพืชที่ผ่านการชักนำให้งอกใหม่

2.5.1. นำต้นข้าวที่งอกใหม่จากอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการงอกใหม่มาเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำการเกิดราก (Rooting medium, RM)ซึ่งจะมีการเสริมฮอร์โมนและไฟทาเจลดังนี้

อาหารสูตร RM-hr เสริมด้วย	NAA	0.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
	BAP	0.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	2.6	กรัมต่อลิตร
อาหารสูตร RM เสริมด้วย	NAA	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
	BAP	1.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	3.0	กรัมต่อลิตร
อาหารสูตร RM + 0.05 NAA เสริมด้วย	NAA	0.05	มิลลิกรัมต่อลิตร
	BAP	0.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	3.0	กรัมต่อลิตร

2.5.2 .ทำการเพาะเลี้ยงในขวดโดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง สังเกตการเจริญของราก

3. การถ่ายยีน

3.1. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacines* ในการถ่ายยีน

3.1.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท

3.1.2. ทำการฟอกฆ่าเชื้อดังข้อ 1.1.1-1.1.5

3.1.3. คีบเมล็ดวางบนอาหารแข็งสูตร NB1 และเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 7-11 วัน

3.1.4 นำแคลลัสที่มีอายุ 7-11 วัน ย้ายลงในอาหาร NB1 ที่ประกอบด้วย อซิโตซิลิงโกน 50 ไมโครโมลลาร์

3.1.5 หยดสารละลายเซลล์ *Agrobacterium* EHA105 PCAMBIA(1301) ซึ่งใช้อาหารสูตร AAM เป็นตัวทำละลายและที่ประกอบด้วย อซิโตซิลิงโกน 1ไมโครโมลลาร์ โดยเตรียมที่ OD 1 0.2 0.1 0.02 0.01 และ 0 นำไปหยดลงที่แต่ละแคลลัสๆละ 15 ไมโครลิตร

3.1.6. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

3.1.7. นำเฉพาะแคลลัสไปล้างด้วยน้ำเติมเซโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัม ต่อลิตรแล้วแช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง พร้อมกับสั่นเป็นระยะแล้วย้ายแคลลัสมาใส่ในไมโครเพลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.8. เติม Gus buffer 2 ให้ท่วมแคลลัส แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 6-8 ชั่วโมง (Li และคณะ,1992)

3.1.9. ย้ายแคลลัสมาเก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์

3.1.10. ทำการตรวจวัดผล

3.1.11. แคลลัสหลังจากตรวจวัดผลแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.ศึกษาผลของอายุแคลัสที่เหมาะสมในการถ่ายยีน

3.2.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60

3.2.2. ทำการฟอกฆ่าเชื้อดังข้อ 3.1.2

3.2.3. นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NB 1 ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 4 7 9 11 และ 16 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในที่มืด

3.2.4. นำแคลลัสที่มีอายุต่างๆกันตามต้องการย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NB 1 เสริมด้วยอซิโตไซลิงโกน 50 ไมโครโมลลาร์ ทำการถ่ายยีนดังข้อ 3.1.5. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

3.2.5. นำเฉพาะแคลลัสไปล้างด้วยน้ำที่ประกอบด้วยเซฟโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วแช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง พร้อมกับสั่นเป็นระยะแล้วย้ายแคลลัสมาใส่ในไมโครเพลท

2.5 ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธี Gus assay ดังข้อ 3.1.8.

3.3 ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่มีระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆในการถ่ายยีน (CO- Culture media)

3.3.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท

3.3.2. ทำการฟอกฆ่าเชื้อดังข้อ 3.1.2-3.1.3

3.3.3 นำแคลลัสที่มีอายุ 7-11 วัน

3.3.4 ย้ายมาเพาะเลี้ยงอาหารแข็งสูตร NB ที่แปรผันระดับ ฮอร์โมนออกซินต่างๆกัน ดัง ตารางภาคผนวกที่ 1 และเติมอซิโตซิลิงโกน 50 ไมโครโมลลาร์ ทำการถ่ายยีนดังข้อ 3.1.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา3 วัน ในที่มืด

3.3.5 นำเฉพาะแคลลัสไปล้างด้วยน้ำเติมเซโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วแช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าเป็นระยะแล้วย้ายแคลลัสมาใส่ในไมโครเพลท

3.3.6ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธี Gus assay ดังข้อ 3.1.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การศึกษาผลของสายพันธุ์ของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน

3.4.1. เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท

3.4.2. ทำการฟอกฆ่าเชื้อดังข้อ 3.1.2-3.1.3

3.4.3 นำแคลลัสที่มีอายุ 7-11 วัน

3.4.4 ย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยด้วยอซิโตซิลิงโกน 50ไมโครโมลลาร์

3.4.5 ทำการถ่ายยีนดังข้อ 3.1.5 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ที่ต่างกัน 3 สายพันธุ์ได้แก่ EHA 105 PCAMBIA(1301) LBA4404 PCAMBIA(1301) และAGL1 PCAMBIA (1301) ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด

3.4.6 นำเฉพาะแคลลัสไปล้างด้วยน้ำที่เติมเซโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วแช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าเป็นระยะแล้วย้ายแคลลัสมาใส่ในไมโครเพลท

3.4.7 ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธี Gus assay ดังข้อ 3.1.8

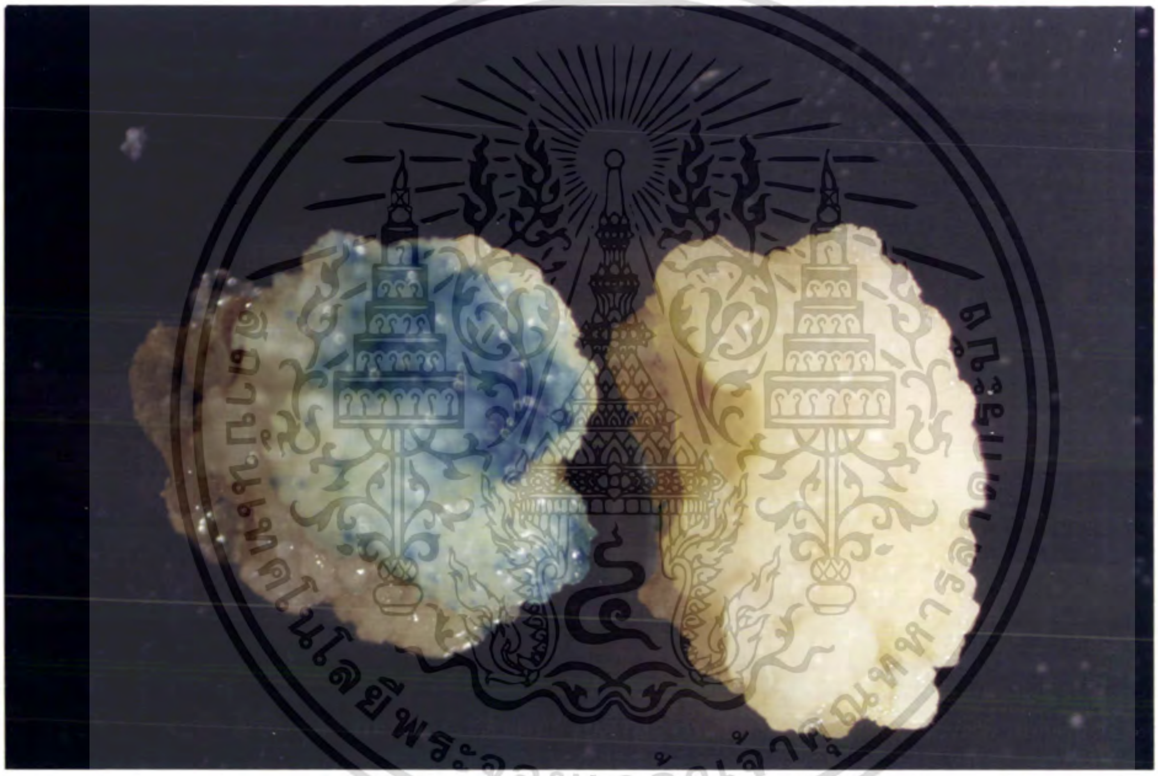
3.5.ศึกษาการคัดเลือกแคลลัสที่ทำการถ่ายยีนแล้ว

นำแคลลัสที่ทำการถ่ายยีนแล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NB 1 ที่เติมเซโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มขนาดของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นเวลา 10-15 วัน แล้วนำส่วนหนึ่งของแต่ละแคลลัสทำการ ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธี Gus Assay นำส่วนแคลลัสที่เหลือแยกเป็นพวกที่มีผลบวกกับผลลบทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยด้วยเซโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 15 วันเพื่อคัดเลือกแคลลัสที่ถ่ายยีนสามารถถ่ายยีนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4 การเพาะเลี้ยง *Agrobacterium tumefaciens* ในอาหารแข็งสูตร AB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แคลลัสที่เป็นชุดควบคุมและชุดทดลองที่ผ่านการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

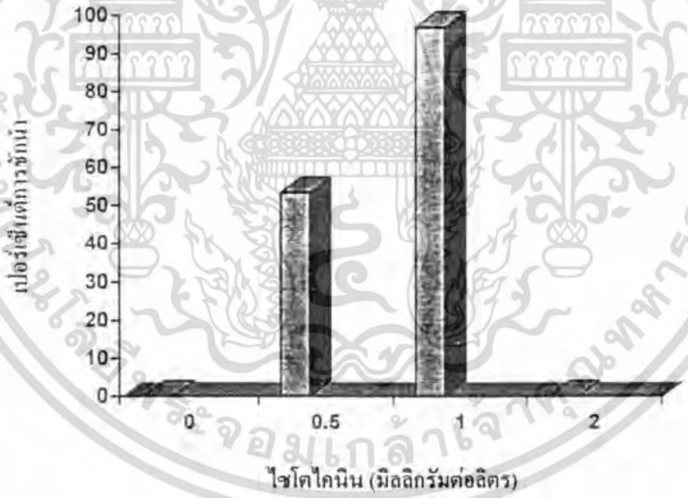
ผลการทดลอง

1. ผลของสารบางชนิดในอาหารที่ ชักนำให้เกิดแคลลัส

1.1 ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

ตารางที่2 แสดงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว123

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่มต้น	80	120	100	40
จำนวนแคลลัส	0	64	97	0
เปอร์เซ็นต์การชักนำ	0	53.33	97	0



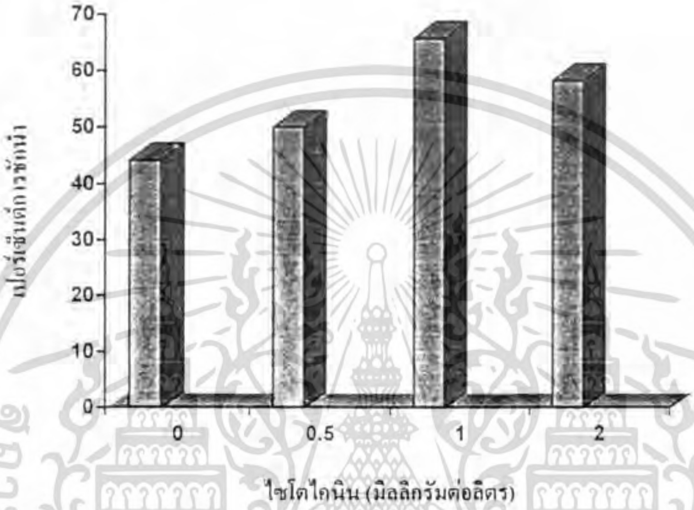
รูปที่ 6 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารต่างๆของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

อาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคลลัสมากที่สุด คือ 97 เปอร์เซ็นต์ และ NB1 เสริมไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 53.33 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่อาหารแข็งสูตร NB1 และ NB1 เสริมไซโตไคนิน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคลลัสเป็น 0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่3 แสดงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่มต้น	120	120	120	120
จำนวนแคลลัส	53	60	79	70
เปอร์เซ็นต์การชักนำ	44.17	50	65.83	58.33



รูปที่ 7 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตนินในอาหารต่างๆของข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ความเข้มข้นของไซโตไคนินที่ระดับต่างๆ ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส คือได้ความถี่ของการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ 58.33 65.83 50 และ 44.17 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 2 1 0.5 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

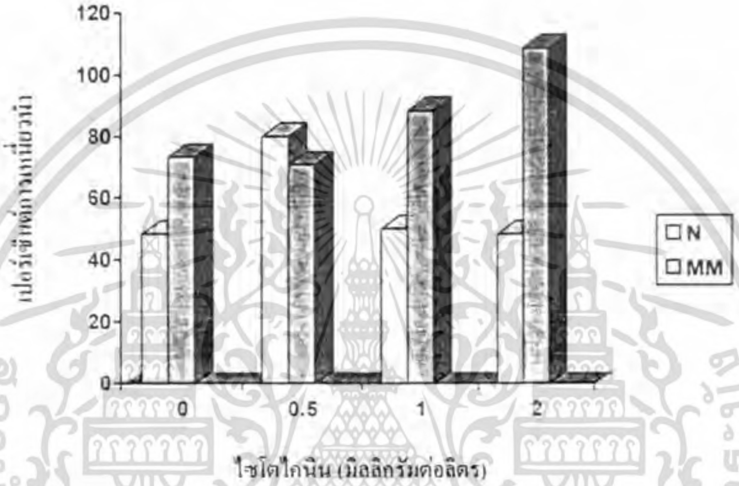
ตารางที่4 แสดงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว123

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่มต้น	60	60	60	60
จำนวนแคลลัส	29	48	30	29
เปอร์เซ็นต์การชักนำ	48.33	80	50	48.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่5</u> แสดงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรปรับปรุงในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท

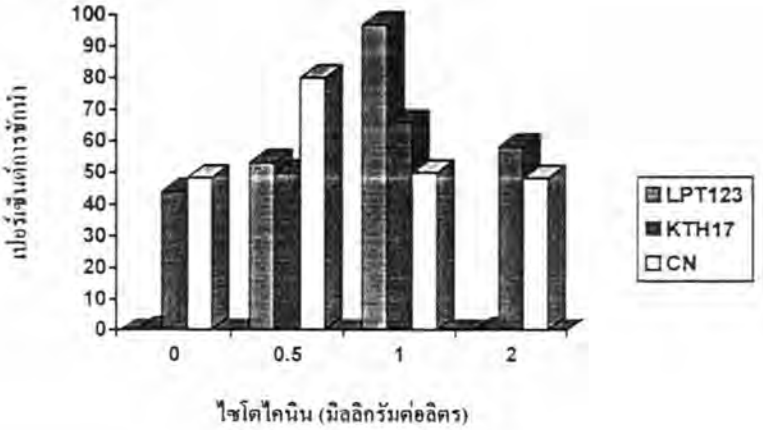
ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่มต้น	23	48	24	23
จำนวนแคลลัส	18	34	24	25
เปอร์เซ็นต์การชักนำ	78.26	70.83	83.33	107.70



รูปที่ 8 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตนินในอาหารแข็งสูตรธรรมดากับสูตรปรับปรุงของข้าวสายพันธุ์ชัยนาท

จากอาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนแคลลัส 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ ขณะที่สูตรอาหารดัดแปลง (MM) ให้จำนวนแคลลัสมากกว่าสูตรธรรมดา (N) มีแต่ สูตรอาหารดัดแปลงเสริมไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้นที่ให้จำนวนแคลลัสน้อยกว่าสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อยู่ 9.17 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

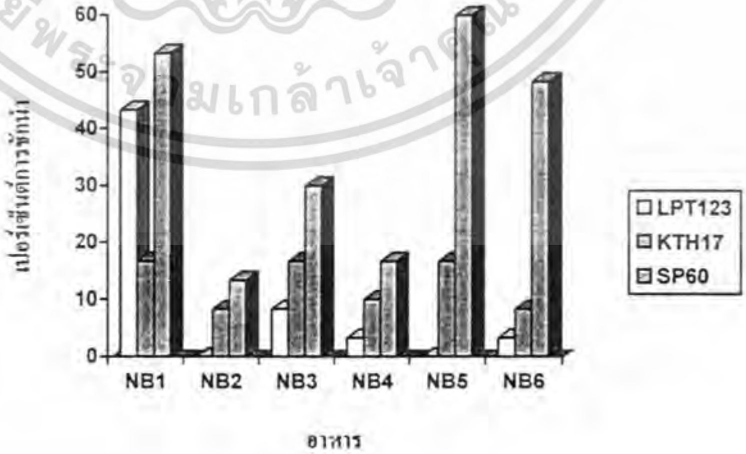


รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมนไซโตนินในอาหารต่างๆของข้าว
สายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาท

1.2 ผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

ตารางที่6 แสดงผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และ ชัยนาท

อาหาร	NB1	NB2	NB3	NB4	NB5	NB6
LPT 123	43.33	0	8.33	3.33	0	3.33
KTH 17	16.67	8.33	16.67	10	16.67	8.33
SP 60	30	13.33	53.33	16.67	60	48.33



รูปที่ 10 กราฟแสดงผลของออกซินในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าว
สายพันธุ์เหลืองประทิว 13 ขาวตาแห้ง 17 และ สุพรรณบุรี 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะอาหารแข็งที่ไม่มี NAA ข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ให้ผลการชักนำที่ต่ำมากอยู่ในช่วง 0-33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ขาวตาแห้งก็เช่นกันให้ผลเป็น 8.33-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น สำหรับข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ปริมาณ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลการชักนำที่ดีที่สุด คิดเป็น 48.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารแข็งที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลการชักนำที่ดีที่สุดสำหรับข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ที่ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ให้ผลการชักนำเท่ากันทั้ง 3 สูตรอาหารแข็งที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ2,4-D 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ผลเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ให้ผลการชักนำมากขึ้นในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D มากขึ้นร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 30 53.33 และ 60 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

1.3 ผลของไซโตไคนิน แอลโพรลีน และเซโฟแทกซิม ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

ตารางที่ 7 แสดงผลของไซโตไคนิน แอลโพรลีน และเซโฟแทกซิม ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ในสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ระดับการงอก	1	2	3	4
อาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร				
P0	0	71.11	4.44	24.44
P0.5	4.44	48.89	6.67	40
P0.5+Cef 50 mg/l	0	46.67	11.11	42.22
P2.5	2.22	57.78	2.22	37.78
อาหารแข็งสูตร NB1				
P0	0	73.33	4.44	22.22
P0.5	0	48.89	20	31.11
P0.5+Cef 50 mg/l	2.22	53.33	11.11	33.33
P2.5	2.22	60	4.44	33.33

แยกระดับการงอกออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1 หมายถึง ไม่มีการงอกของเมล็ด

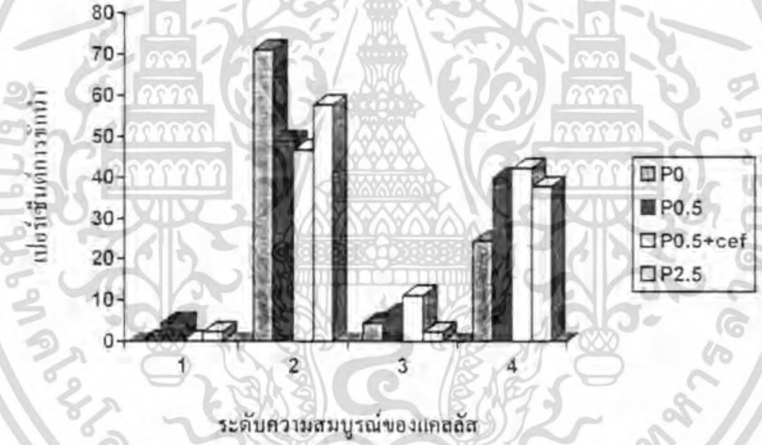
2 หมายถึง เมล็ดงอกแต่ไม่มีแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 หมายถึง มีแคลลัสแต่แคลลัสไม่สมบูรณ์

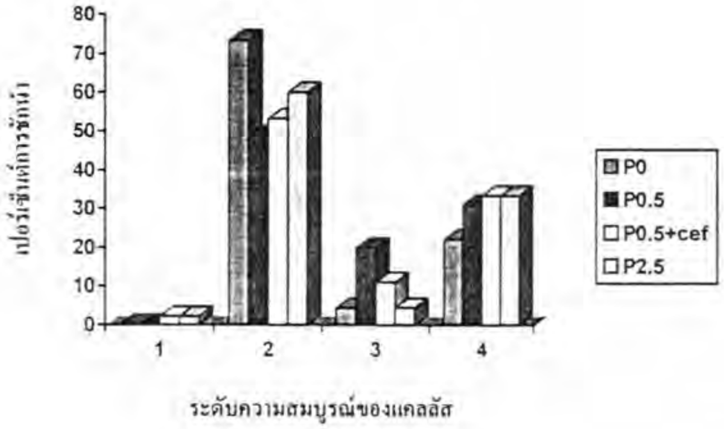
4 หมายถึง แคลลัสที่งอกสมบูรณ์ (สามารถนำไปใช้ถ่ายยืนได้)

อาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NB1 เห็นได้ว่า อาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ได้มากกว่าNB1 ส่วนแอลโพรลีนที่เติมลงไปนั้นมีผลทำให้ได้แคลลัสที่สมบูรณ์ปริมาณมากขึ้นอย่างในอาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิต ที่ไม่เติมแอลโพรลีนให้ค่าเป็น 24.44 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมแอลโพรลีนให้ค่ามากขึ้นเป็น 40 และ37.78 เปอร์เซ็นต์ตามปริมาณแอลโพรลีนที่ประกอบอยู่ในอาหาร 0.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ใน NB1ก็ทำนองเดียวกัน แต่ปริมาณแอลโพรลีนที่เติมใน NB1 ทั้ง 0.5 และ 2.5 กรัมต่อลิตรให้ผลใกล้เคียงกัน เซฟโฟแทกซีมที่เติมในอาหารที่มีแอลโพรลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรก็ให้ผลที่แตกต่างจากสภาวะที่ไม่เติมน้อยมากคือ 2.22 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกันในทั้ง อาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NB1



รูปที่ 11 กราฟแสดงผลของไซโตไคนินแอลโพรลีน และ เซฟโฟแทกซีม
ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเสริม ไซโตไคนิน 1มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงผลของไซโตไคนินแอลโพรลีน และ เซฟโฟแทกซีม ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสไม่เสริมไซโตไคนิน (NB1) ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ตารางที่ 8 แสดงผลของไซโตไคนิน แอลโพรลีน และ เซโฟแทกซิม ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ในสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

ระดับการงอก	1	2	3	4
อาหารแข็งNB1				
P0	0	50.17	4.17	36.67
P0+Cef 50 mg/l	0	34.29	12.14	53.57
P1.4	0	45.83	12.50	41.67
P2.8	0	55	4	41
P2.8+Cef 50	0	47.14	10	42.86
P4.2	0	59	0	41

แยกระดับการงอกออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

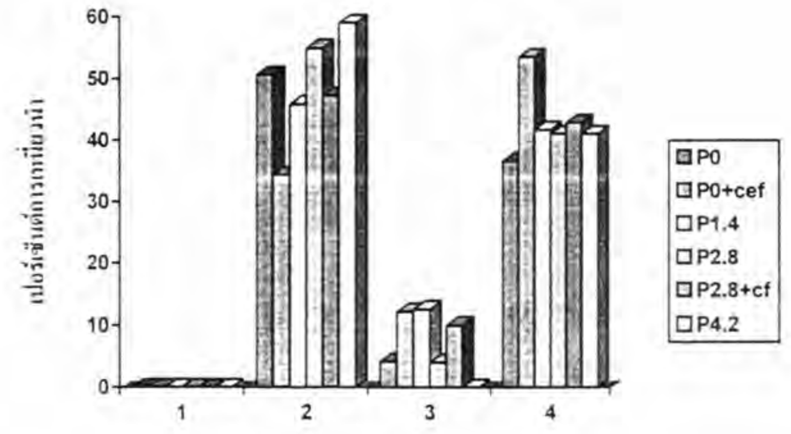
1 หมายถึง ไม่มีการงอกของเมล็ด

2 หมายถึง เมล็ดงอกแต่ไม่มีแคลลัส

3 หมายถึง มีแคลลัสแต่แคลลัสไม่สมบูรณ์

4 หมายถึง แคลลัสที่งอกสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 กราฟแสดงผลของไซโตไคนิน แอลโพรลีน และ เซฟโฟแทกซีม
ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสไม่เสริม(NB1)ไซโตไคนินในข้าวสายพันธุ์ขาวดาแห้ง17

ในการเติมแอลโพรลีนในอาหาร ไม่ว่าจะเป็นที่ความเข้มข้น 1.4 2.8 และ 4.2 กรัมต่อลิตร ต่างก็ให้จำนวนแคลลัสที่มีความสมบูรณ์ใกล้เคียงกันคือประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าในอาหารที่ไม่ได้เติมแอลโพรลีนเลยซึ่งให้ผลเพียง36.67เปอร์เซ็นต์ในขณะที่การเติมเซฟโฟแทกซีมในอาหารที่ไม่มีแอลโพรลีนจะให้จำนวนแคลลัสที่สมบูรณ์มากกว่าในอาหารที่ไม่ได้เติมเซฟโฟแทกซีมคือ 53.57 และ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารที่มีแอลโพรลีน2.8 กรัมต่อลิตร การเติมเซฟโฟแทกซีมจะทำให้ได้แคลลัสที่มีความสมบูรณ์มากกว่าเล็กน้อย คือ 42.86 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ถ้าไม่เติมเซฟโฟแทกซีมจะได้ 41 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่ 9</u> **แสดงผลของไซโตไคนิน แอลโพรลีน และเซโฟแทกซิม ในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ในสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60**

ระดับการงอก	1	2	3	4
<u>อาหารแข็งประกอบด้วยไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร</u>				
P0	0	46.67	20	10
P0.15	0	43.33	16.67	40
P0.3	0	30.30	9.09	60.61
P0.5	0	55.56	11.11	33.33
P0.5 +Cef 50	0	42.22	22.22	35.56
<u>อาหารแข็ง NB1</u>				
P0	0	16.67	13.33	70
P0.15	0	27.27	0	72.72
P0.3	0	30.30	0	60.61
P0.5	0	23.33	20	56.67
P0.5+Cef 50	0	35.56	11.11	53.33

แยกระดับการงอกออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1 หมายถึง ไม่มีการงอกของเมล็ด

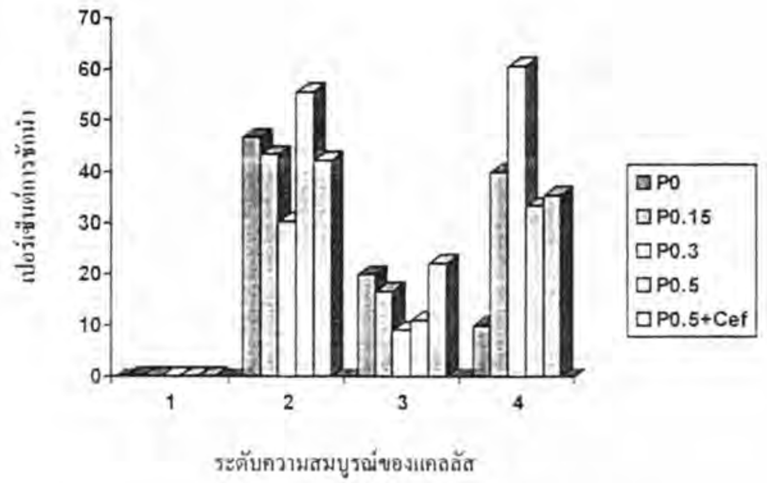
2 หมายถึง เมล็ดงอกแต่ไม่มีแคลลัส

3 หมายถึง มีแคลลัสแต่แคลลัสไม่สมบูรณ์

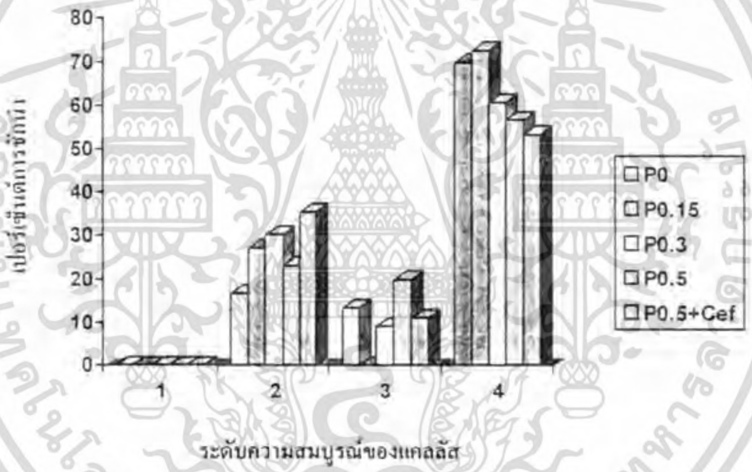
4 หมายถึง แคลลัสที่งอกสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 กราฟแสดงผลของไซโตไคนิน แอลโพรลีน และ เซฟโฟแทกซีม
ในอาหารที่ชักให้เกิดแคลลัสที่เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี60



รูปที่ 15 กราฟแสดงผลของไซโตไคนินแอลโพรลีน และ เซฟโฟแทกซีม
ในอาหารที่ชักให้เกิดแคลลัสไม่เสริมไซโตไคนิน (NB1)ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี60

จากตารางผลการทดลองพบว่าในอาหาร ที่ มีแอลโพรลีนเท่ากัน อาหารแข็งสูตร NB1 ให้ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์มากกว่าอาหารแข็งสูตร NB1 เสริมไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นในอาหารที่มีแอลโพรลีน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้ผลการชักนำเท่ากันทั้ง 2 อาหาร ในอาหารแข็งสูตรNB1ที่มีแอลโพรลีน 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การชักนำสูงสุดประมาณ 72.72 เปอร์เซ็นต์ และการเสริมเซฟโฟแทกซีมในอาหารที่มีแอล 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการชักนำไม่แตกต่างจากอาหารที่ไม่ได้เสริม เซฟโฟแทกซีม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของ2,4-D 3,4-D และแอลโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส

ตารางที่10 แสดง ผลของ2,4-D 3,4-D และแอลโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ระดับการงอก	1	2	3	4
NB1 New	3.33	73.33	10	13.33
NB 3,4-D	5	75	15	5
NB P2.8	3.33	63.33	30	3.33

แยกระดับการงอกออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1 หมายถึง ไม่มีการงอกของเมล็ด

2 หมายถึง เมล็ดงอกแต่ไม่มีแคลลัส

3 หมายถึง มีแคลลัสแต่แคลลัสไม่สมบูรณ์

4 หมายถึง แคลลัสที่งอกสมบูรณ์

รูปที่ 16 กราฟแสดงผลของ2,4-D 3,4-D และแอลโพรลีนในอาหาร ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

เมื่อเปรียบเทียบผลของจำนวนแคลลัสที่สมบูรณ์ระหว่างอาหารแข็ง NB1 ที่มีแอลโพรลีน 0.5 กรัมต่อลิตรกับอาหารแข็งNB1 ที่เปลี่ยนแปลงแอลโพรลีนเป็น 2.8 กรัมต่อลิตรพบว่าในอาหารที่มีแอลโพรลีน 0.5 กรัมต่อลิตรให้จำนวนแคลลัสมากกว่าอย่างชัดเจน คือ 13.33 และ 3.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ 2,4-D และ 3,4-D พบว่าอาหารที่ใช้ 2,4-D ให้ผลเป็น 13.33 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ถ้าใช้ 3,4-D จะให้ผลเพียง 6.67 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางแสดงที่11</u> **ผลของ2,4-D 3,4-D และ แอลโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17**

ระดับการงอก	1	2	3	4
NB1 New	0	0	0	100
NB 3,4-D	0	40	26.67	33.33
NB P2.8	13.33	0	0	86.67

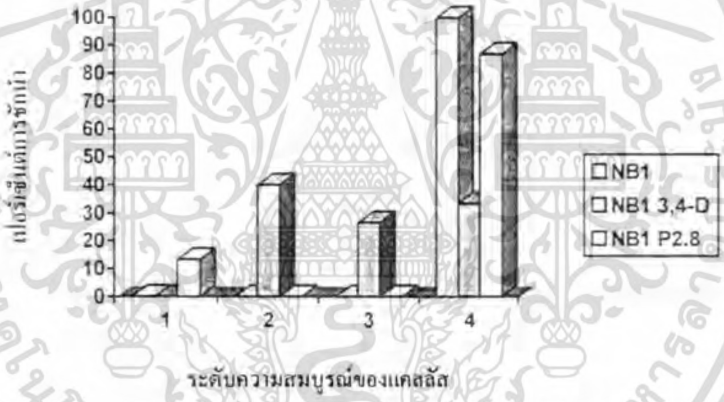
แยกระดับการงอกออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1 หมายถึง ไม่มีการงอกของเมล็ด

2 หมายถึง เมล็ดงอกแต่ไม่มีแคลลัส

3 หมายถึง มีแคลลัสแต่แคลลัสไม่สมบูรณ์

4 หมายถึง แคลลัสที่งอกสมบูรณ์



รูปที่ 17 กราฟแสดงผลของ2,4-D 3,4-D และ แอลโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

จำนวนแคลลัสที่สมบูรณ์จากอาหารที่มีแอลโพรลีน 0.5 กรัมต่อลิตรให้ผลเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลที่ได้จากอาหารที่มีแอลโพรลีน 2.8 กรัมต่อลิตร คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าอาหารที่ใช้ 3,4-D คือ 33.33 เปอร์เซ็นต์อย่างเห็นได้ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่12</u> **แสดงผลของ2,4-D 3,4-D และ แอลโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60**

ระดับการงอก	1	2	3	4
NB1 New	0	13.33	60	26.67
NB 3,4-D	0	66.67	26.67	6.67
NB P2.8	0	0	33.33	66.67

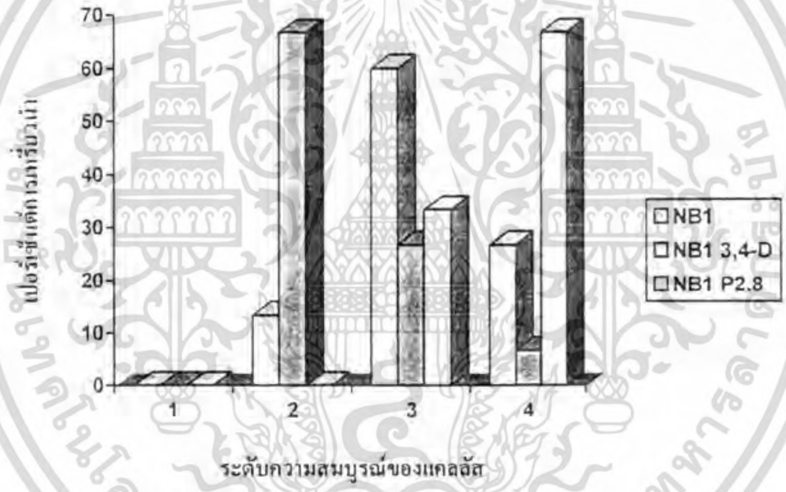
แยกระดับการงอกออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

1 หมายถึง ไม่มีการงอกของเมล็ด

2 หมายถึง เมล็ดงอกแต่ไม่มีแคลลัส

3 หมายถึง มีแคลลัสแต่แคลลัสไม่สมบูรณ์

4 หมายถึง แคลลัสที่งอกสมบูรณ์



รูปที่ 18 กราฟแสดงผลของ2,4-D 3,4-D และแอลโพรลีนในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี60

จำนวนแคลลัสที่สมบูรณ์จากอาหารที่มีแอลโพรลีน 0.5 กรัมต่อลิตรให้จำนวนแคลลัสน้อยกว่าจากอาหารที่ใช้แอลโพรลีน 2.8 กรัมต่อลิตร คือ 26.67 เปอร์เซ็นต์ และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และถ้าเปลี่ยนจากการใช้ 2,4-D เป็น 3,4-D ก็จะให้ผลลดลงเป็นอย่างมาก จาก 26.67 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 6.67 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

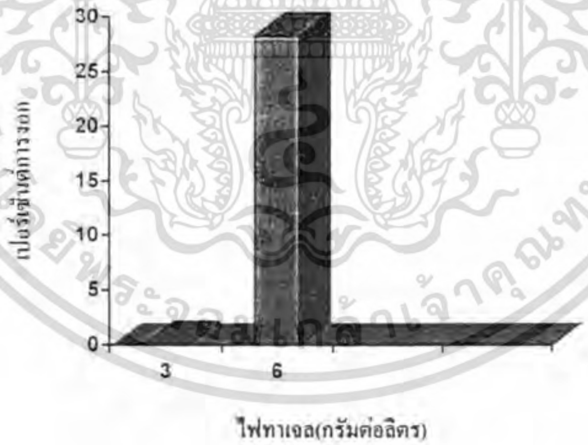
2. การชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.1. ผลของความเครียดของน้ำที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

จากกราฟจะเห็นได้ว่าการเสริมไฟทาเจล 6 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้มีสภาพความเครียดของน้ำสูงขึ้นซึ่งในสภาพนี้แคลลัสจะเกิดการงอกใหม่ได้ดีกว่าในสภาพที่มีไฟทาเจล 3 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งจะมีความถี่ของการงอกใหม่เป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเสริมไฟทาเจล 6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ความถี่ของการงอกใหม่ถึง 28.3 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 แสดงผลของความเครียดของน้ำที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหมในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ไฟทาเจล	3	6
จำนวนเริ่ม	98	106
จำนวนงอก	0	30
เปอร์เซ็นต์	0	28.30



รูปที่ 19 กราฟแสดงผลของความเครียดของน้ำที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหมในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2. ผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเรามีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินลงในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (NB1) แล้วนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จะเห็นว่าแคลลัสที่ได้รับการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินจะมีความถี่ของการเกิดเป็นต้นใหม่ (regeneration frequency) อย่างเห็นได้ชัด เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 30 วันของการทดลองในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ความถี่ของการงอกใหม่ของแคลลัสที่ไม่ได้รับการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินจะเป็น 11.43 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 14.29 เปอร์เซ็นต์ 20.41 เปอร์เซ็นต์ และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเสริมไซโตไคนิน 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่14 แสดงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และ ชัยนาท

สายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่ม	35	35	49	30
จำนวนงอก	4	5	10	9
เปอร์เซ็นต์	11.43	14.29	20.41	30

สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่ม	44	52	60	52
จำนวนงอก	0	3	1	4
เปอร์เซ็นต์	0	5.77	1.67	7.69

สายพันธุ์ชัยนาท

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
จำนวนเริ่ม	20	20	20	20
จำนวนงอก	0	0	0	0
เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	MM8	MM7	MM6	MM3
จำนวนเริ่ม	20	20	20	20
จำนวนงอก	0	0	0	0
เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0

สำหรับข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 5.77 เปอร์เซ็นต์ 1.67 เปอร์เซ็นต์ และ 7.69 เปอร์เซ็นต์ จากแคลลัสที่ได้รับการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนิน 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่แคลลัสที่ไม่ได้รับการเสริมฮอร์โมนมีความถี่ของการงอกใหม่ 0 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 20 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแคลลัสที่ได้รับการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนิน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ความถี่ของการงอกใหม่สูงสุดทั้งในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 โดยเราทำการเสริมฮอร์โมนนี้ในรูปของไคเนติน และ BAP และหลังจากเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 30 วัน (รวมเป็น 60 วัน)สำหรับข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์นี้พบว่าไม่มีการงอกใหม่เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้เรายังได้ทำการทดลองในข้าวสายพันธุ์ชัยนาทซึ่งพบว่าแคลลัสจากข้าวสายพันธุ์นี้ไม่มีการงอกใหม่เกิดขึ้นเลยเมื่อใช้อาหารชักนำให้เกิดการงอกใหม่สูตรเดียวกันกับข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 โดยสังเกตุพบว่าแคลลัสจะมีการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีเขียวของเซลล์เท่านั้น และเมื่อนำแคลลัสจากข้าวสายพันธุ์ชัยนาทที่มาจากอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสอีกสูตรหนึ่ง ซึ่งได้รับการปรับปรุงแล้วมาชักนำให้เกิดการงอกใหม่ก็พบว่าความถี่ของการงอกใหม่แทบจะไม่มีความแตกต่างจากอาหารสูตรเดิมเลย

รูปที่ 20 กราฟแสดงผลของฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหมในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และ ชัยนาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 21 แสดงจุดเขียวของแคลลัสที่กำลังชักนำให้เกิดการงอกใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 10-12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 22 แสดงให้เห็นถึงการเริ่มงอกของแคลลัสที่กำลังชักนำ
ให้เกิดการงอกใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 15-20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 23 แสดงการงอกเป็นเป็นต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 30-37 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3. ผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

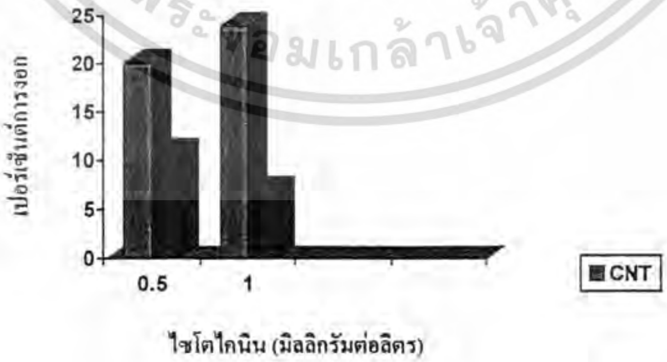
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 30 วันจะได้ผลการทดลองดังตารางที่ 15 จะเห็นได้ว่าผลกระทบระหว่างกรดแอบไซซิค และฮอร์โมนไซโตไคนินที่ 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 มีความถี่ของการงอกใหม่เป็น 10.81 เปอร์เซ็นต์ และ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลกระทบของฮอร์โมนไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวพบว่าความถี่ของการงอกใหม่มีความถี่สูงกว่าการใช้กรดแอบไซซิค (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมด้วย

สำหรับข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 พบว่าการใช้กรดแอบไซซิคร่วมกับฮอร์โมนไซโตไคนินที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากรดแอบไซซิคมีผลทำให้มีการชักนำให้เกิดการงอกใหม่มากขึ้นคือมีความถี่ของการงอกใหม่เป็น 22.37 เปอร์เซ็นต์ 6.67 เปอร์เซ็นต์ 3.9 เปอร์เซ็นต์ และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งเมื่อใช้แต่ฮอร์โมนไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวพบว่ามีความถี่ของการงอกใหม่เป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในทุกความเข้มข้นของฮอร์โมนไซโตไคนินที่ใช้

<u>**ตารางที่15**</u> แสดงผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ไซโตไคนิน	0.5	1
กรดแอบไซซิค	0	0
จำนวนเริ่ม	40	42
จำนวนงอก	8	10
เปอร์เซ็นต์	20	23.81

ไซโตไคนิน	0.5	1
กรดแอบไซซิค	5	5
จำนวนเริ่ม	37	58
จำนวนงอก	4	4
เปอร์เซ็นต์	10.81	6.9



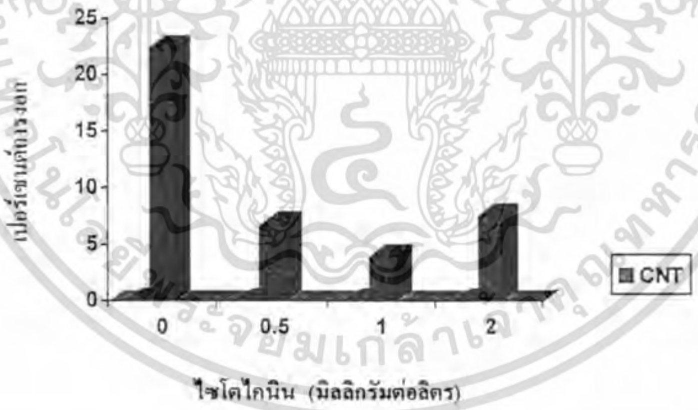
รูปที่ 24 กราฟแสดงผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่16 แสดงผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
กรดแอบไซซิค	0	0	0	0
จำนวนเริ่ม	40	40	40	40
จำนวนงอก	0	0	0	0
เปอร์เซ็น	0	0	0	0

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
กรดแอบไซซิค	5	5	5	5
จำนวนเริ่ม	76	60	128	120
จำนวนงอก	17	4	5	9
เปอร์เซ็นต์	22.37	6.67	3.9	7.5



รูปที่ 25 กราฟแสดงผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

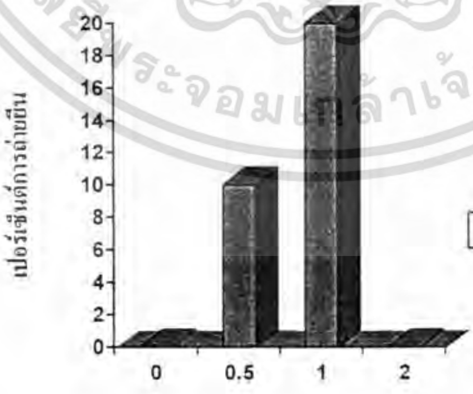
เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 30 วัน (รวมเป็น 60 วัน) พบว่าข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 จะมีความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มขึ้นในแคลลัสที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมกรดแอบไซซิค 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับฮอร์โมนไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 4.67 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 60 วัน แต่แม้ว่าการใช้กรดแอบไซซิคร่วมกับฮอร์โมนไซโตไคนิน จะทำให้ความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มขึ้น แต่ว่าความถี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของการงอกใหม่ที่เพิ่มขึ้นนี้ก็ยังเป็นค่าความถี่ที่น้อยมากจึงได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่ (RN) โดยเสริม NAA ให้น้อยลงเหลือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียกอาหารสูตรนี้ว่า MC_1

<u>ตารางที่17</u> แสดงผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้งในอาหารแข็ง RN ที่เสริม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
กรดแอบไซซิค	0	0	0	0
จำนวนเริ่ม	30	30	30	30
จำนวนงอก	0	0	0	0
เปอร์เซ็นต์	0	0	0	0
ไซโตไคนิน	0	0.5	1	2
กรดแอบไซซิค	5	5	5	5
จำนวนเริ่ม	24	40	40	32
จำนวนงอก	0	4	8	0
เปอร์เซ็นต์	0	10	20	0



รูปที่ 26 กราฟแสดงผลของกรดแอบไซซิคที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้งในอาหารแข็ง RN ที่เสริม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 30 วัน จะเห็นได้ว่าแคลลัสที่ได้นำมาชักนำให้งอกเป็นต้นใหม่ในอาหารชักนำให้เกิดการงอกใหม่ (RN) เสริมด้วย NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มขึ้นจากแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงโดยการเสริมกรดแอบไซซิค 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับฮอร์โมนไซโตไคนินที่ 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 10เปอร์เซ็นต์ และ 20เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับจะเห็นได้ว่าในข้าวสายพันธุ์นี้การเสริม NAA ให้น้อยลงเหลือเพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ยังไม่สามารถทำให้ความถี่ของการงอกใหม่มีค่าอยู่ในระดับที่น่าพอใจได้ และเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 60 วันก็พบว่ามีเพียงแคลลัสที่เพาะเลี้ยงโดยผ่านการเสริมกรดแอบไซซิค 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับฮอร์โมนไซโตไคนินที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มจาก 20 เปอร์เซ็นต์ เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังคงมีความถี่ของการงอกใหม่เท่าเดิม

2.4.ผลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิกที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

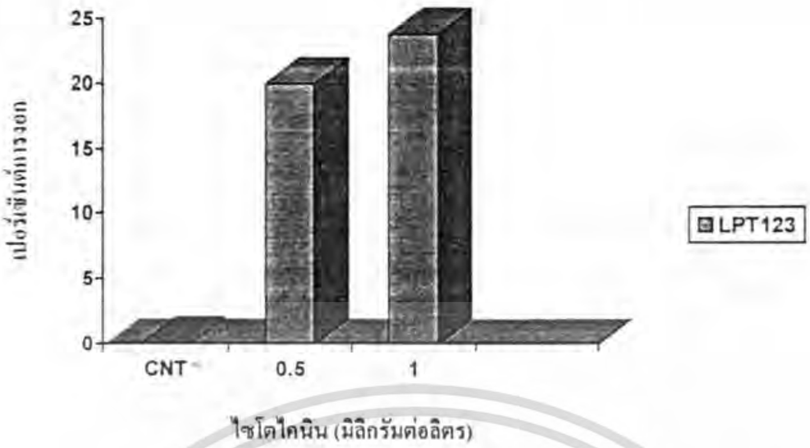
จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ในอาหารที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่ที่เสริมด้วยกรดจิบเบอเรลลิน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารชักนำให้เกิดการงอกใหม่ที่เสริมด้วยกรดจิบเบอเรลลินนี้ไม่มีผลทำให้ความถี่ของการงอกใหม่เพิ่มขึ้นเลย คือยังคงเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ อยู่เช่นเดิม ขณะที่การใช้ชักนำให้เกิดการงอกใหม่ที่ไม่เสริมด้วยกรดจิบเบอเรลลินจะทำให้มีความถี่ของการงอกใหม่ที่ดีกว่าดังตารางที่ 18

<u>ตารางที่18</u> แสดงแสดงผลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิกที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

ไซโตไคนิน	0.5	1
จิบเบอเรลลิก	0	0
จำนวนเริ่ม	40	40
จำนวนงอก	0	0
เปอร์เซ็นต์	0	0

ไซโตไคนิน	0.5	1
จิบเบอเรลลิก	4	4
จำนวนเริ่ม	40	42
จำนวนงอก	8	10
เปอร์เซ็นต์	20	23.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 27 กราฟแสดงผลของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิกที่มีต่อการชักนำให้เกิดการงอกใหม่

2.5. ผลของ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดระบบรากของพืชที่ผ่านการชักนำให้งอกใหม่

พบว่าในพืชทุกชนิดที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการงอกใหม่จะมีการพัฒนาระบบรากในอาหารชักนำให้เกิดระบบรากที่เสริม NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรดีที่สุด โดยจะสังเกตุเห็นรากแขนงมากมายพร้อมกับขนรากซึ่งมีจำนวนมากกว่าอาหารชักนำให้เกิดระบบรากที่ไม่เสริมฮอร์โมนอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่การพัฒนาระบบรากในอาหารชักนำให้เกิดระบบรากตามปกติจะมีรากแขนงน้อยมากอย่างเห็นได้ชัดและแทบจะไม่มีขนรากปรากฏเลย

<u>ตารางที่19</u> แสดงผลของ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดระบบรากของพืชที่ผ่านการชักนำให้งอกใหม่ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ไซโตไคนิน(มก./ล.)	อาหาร RM	อาหาร RM-hr	อาหาร RM+0.05NAA
0 0.5 1 2	มีรากแขนงและขนรากเพียงเล็กน้อยเท่านั้น	มีรากแขนงและขนรากแต่น้อยกว่าที่เกิดขึ้นในอาหาร RM+0.05NAA	มีรากแขนงและขนรากมากมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 28 แสดงต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 29 แสดงต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 3 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 30 แสดงรวงข้าวที่เกิดจากแคลลัสที่ชักนำให้เกิดการงอกใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

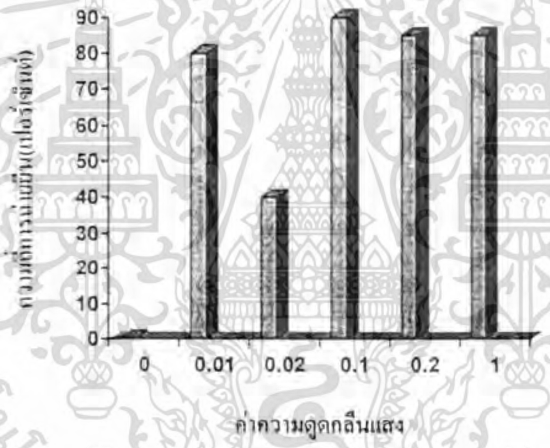
3. ผลการถ่ายยีน

3.1ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Agrobacterium tumefacines* ในการถ่ายยีน

จะเห็นได้ว่าในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ทุกความเข้มข้นเซลล์สามารถให้ผลเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่งยกเว้นที่ ค่าความดูดกลืนแสง 0.02 เท่านั้นที่ยังให้ผลที่ต่ำ ซึ่งที่ ค่าความเข้มข้นแสง 0.1 จะสามารถให้ผลสูงสุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่20 แสดงผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมในการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ค่าความดูดกลืนแสง	0	0.01	0.02	0.1	0.2	1
จำนวนเริ่ม	20	20	20	20	20	20
จำนวนที่ถ่ายยีนแล้ว	0	16	8	18	17	17
เปอร์เซ็นต์	0	80	40	90	85	85



รูปที่ 31 กราฟแสดงผลของความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123

ตารางที่21 แสดงผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมในการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 และ ชัยนาท

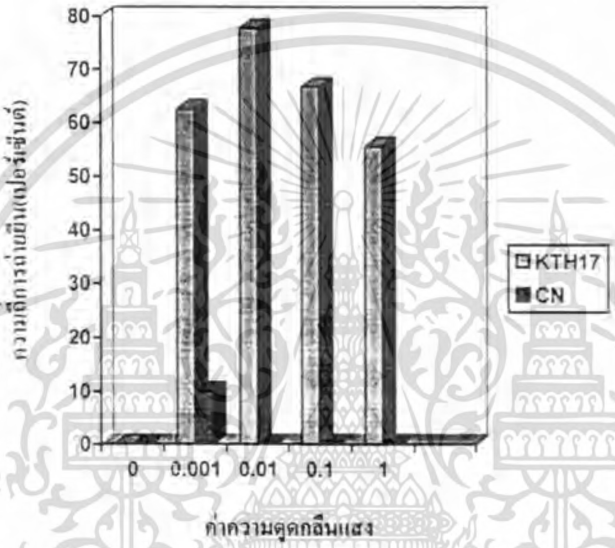
สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

ค่าความดูดกลืนแสง	0	0.001	0.01	0.1	1
จำนวนเริ่ม	18	16	18	18	18
จำนวนที่ถ่ายยีนแล้ว	0	10	14	12	10
เปอร์เซ็นต์	0	62.5	77.78	66.67	55.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ชัยนาท

ค่าความดูดกลืนแสง	0	0.001	0.01	0.1	1
จำนวนเริ่ม	20	20	20	20	20
จำนวนที่ถ่ายยีนแล้ว	0	2	0	0	0
เปอร์เซ็นต์	0	10	0	0	0



รูปที่ 32 กราฟแสดงผลของความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสม ในการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 และพันธุ์ชัยนาท

3.2.ผลของอายุแคลลัสที่เหมาะสมในการถ่ายยีน

อายุของแคลลัสจะทำให้ขนาดและลักษณะของแคลลัสต่างกัน ประสิทธิภาพการถ่ายยีนยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าวด้วย ข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 จะมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดที่อายุแคลลัส 7 วันคิดเป็น ความถี่ของการถ่ายยีน 40 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ขาวตาแห้ง17 จะมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดที่อายุแคลลัส 11 วันคิดเป็น ความถี่ของการถ่ายยีน 50 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ชัยนาทมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดที่อายุแคลลัส 9 วันคิดเป็นความถี่ของการถ่ายยีน 20 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่22 แสดง ผลการถ่ายยีนในแคลลัสอายุต่างๆกันในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และ สุพรรณบุรี 60

สายพันธุ์เหลืองประทิว 123

จำนวน	วัน						
	CNT	4	7	9	11	14	16
เริ่มต้น	10	22	20	20	20	20	20
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	0	6	8	8	2	0	6
ความถี่ของการถ่ายยีน	0	27.3	40	40	20	0	30

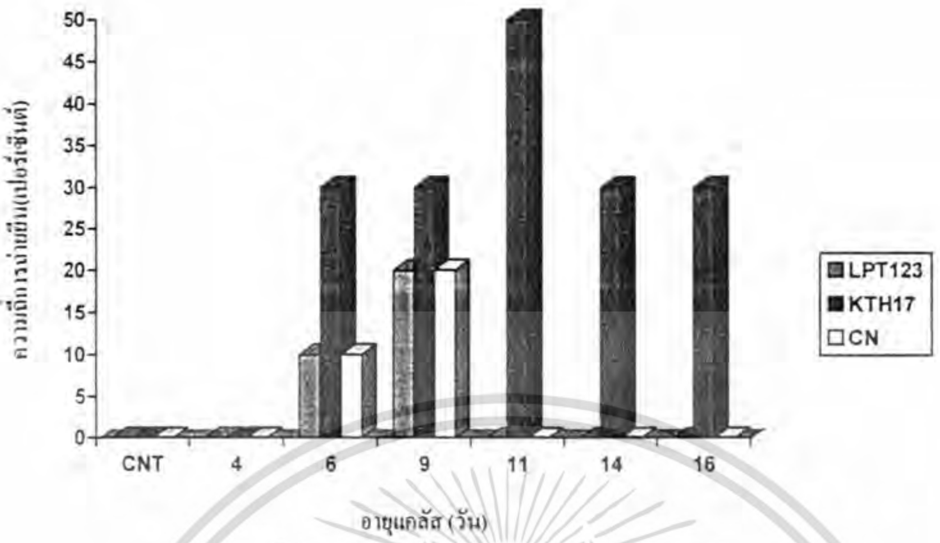
สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

จำนวน	วัน						
	CNT	4	7	9	11	14	16
เริ่มต้น	10	20	20	20	20	20	20
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	0	0	6	6	10	6	6
ความถี่ของการถ่ายยีน	0	0	30	30	50	30	30

สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

จำนวน	วัน						
	CNT	4	7	9	11	14	16
เริ่มต้น	10	20	20	20	20	20	20
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	0	0	2	4	0	0	0
ความถี่ของการถ่ายยีน	0	0	10	20	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 33 กราฟแสดงผลการถ่ายยีนในแคลลัสที่มีอายุต่างๆ กัน

3.3 ผลของการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกัน

ข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123เหมาะในอาหารเพาะเลี้ยงร่วม NB1+AS คิดเป็นความถี่ของการถ่ายยีน 50 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ขาวตาแห้ง17 เหมาะในอาหารเพาะเลี้ยงร่วม NB4+AS คิดเป็นความถี่ของการถ่ายยีน 100 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 เหมาะในอาหารเพาะเลี้ยงร่วม NB1+AS คิดเป็นความถี่ของการถ่ายยีน 60 เปอร์เซ็นต์

<u>ตารางที่23</u> แสดงผลการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกันในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และ สุพรรณบุรี 60

สายพันธุ์เหลืองประทิว 123

อาหาร / จำนวน	C	1		2		3		4		5		6	
	วัน	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10
เริ่มต้น	20	30	12	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	0	15	12	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
ความถี่ของการถ่ายยีน	0	50	50	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0

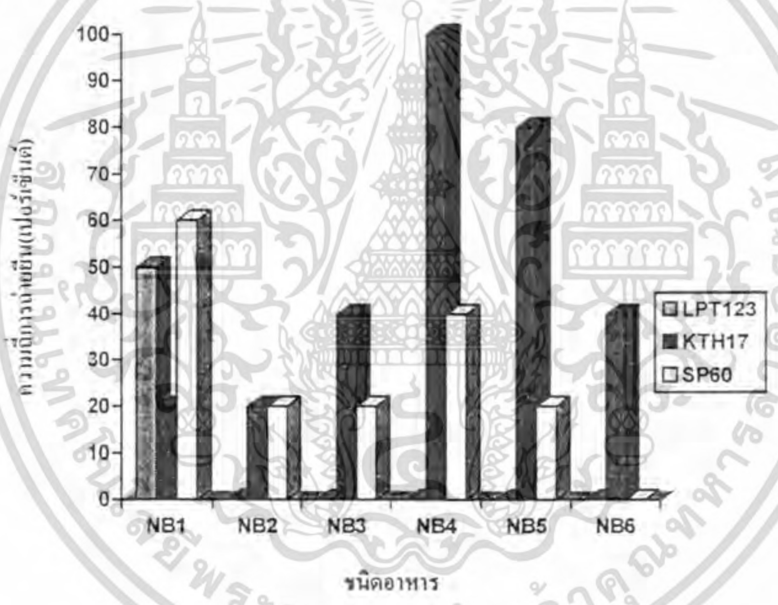
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

อาหาร / จำนวน	C	1		2		3		4		5		6	
	วัน	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10
เริ่มต้น		30	30	30	30	30	30	30	24	30	30	30	30
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว		6	18	6	18	12	18	30	24	24	30	12	18
ความถี่ของการถ่ายยีน		20	100	20	60	40	60	100	100	80	100	40	60

สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

อาหาร / จำนวน	C	1		2		3		4		5		6	
	วัน	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10	3	10
เริ่มต้น	20	30	30	30	18	30	30	30	30	30	30	30	30
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	0	18	18	6	6	6	30	12	24	6	24	0	24
ความถี่ของการถ่ายยีน	0	60	60	20	33	20	100	40	80	20	80	0	80



รูปที่ 34 กราฟแสดงผลการถ่ายยีนในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่ระดับฮอร์โมนออกซินต่างๆกัน ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60

3.4 ผลของการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ต่างๆ

การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ทั้ง 3 สายพันธุ์ EHA 105PCAMBIA(1301) LBA4404 PCAMBIA(1301) และ AGL1 PCAMBIA(1301) EHA 105 PCAMBIA(1301) LBA4404 PCAMBIA(1301) และ AGL1 PCAMBIA(1301) มีค่าความถี่ของการถ่ายยีนใกล้เคียงกันดังตารางที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่24</u> **แสดง ผลของการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ต่างๆในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60**

สายพันธุ์เหลืองประทิว 123

สายพันธุ์ / จำนวน	EHA 105 PCAMBIA (1301)	AGL 1 PCAMBIA (1301)	LBA 4404 PCAMBIA (1301)
เริ่มต้น	24	14	16
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	2	2	2
ความถี่การถ่ายยีน	8.33	14.29	12.5

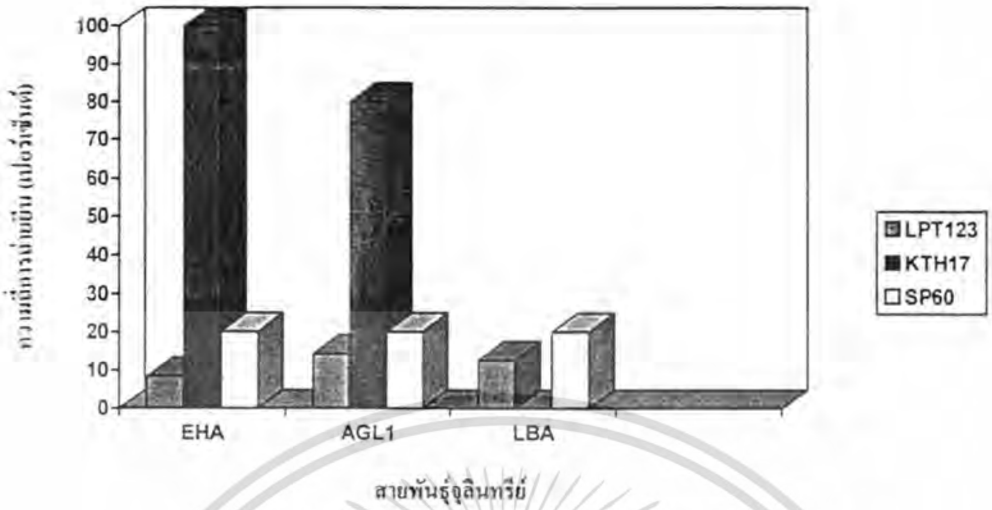
สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17

สายพันธุ์ / จำนวน	EHA 105 PCAMBIA (1301)	AGL 1 PCAMBIA (1301)
เริ่มต้น	30	80
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	30	24
ความถี่การถ่ายยีน	100	80

สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

สายพันธุ์ / จำนวน	EHA 105 PCAMBIA (1301)	AGL 1 PCAMBIA (1301)	LBA 4404 PCAMBIA (1301)
เริ่มต้น	30	30	30
แคลลัสที่ถ่ายยีนแล้ว	6	6	6
ความถี่การถ่ายยีน	20	20	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 35 กราฟแสดงผลการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ต่าง ๆกัน ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60

3.5 ผลการคัดเลือกแคลลัสที่ทำการถ่ายยีนแล้ว

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง NB1 เสริมด้วยไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและเซโฟแทกซิม 500 มิลลิกรัมต่อลิตรตายทั้งหมดแสดงว่าความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน สูงเกินไปจึงลดลงเป็น 25 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งแคลลัสสามารถเจริญได้เกือบทั้งหมดทั้งผลการถ่ายยีนที่เป็นผลบวก และผลลบ เพราะฉะนั้นจึงต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วง 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อคัดเลือกแคลลัสที่สามารถถ่ายยีนได้จริงแล้วชักนำให้เกิดเป็นต้นซึ่งจะเป็นวิธีเดียวกับการถ่ายยีนที่ต้านทานโรคให้กับพืช

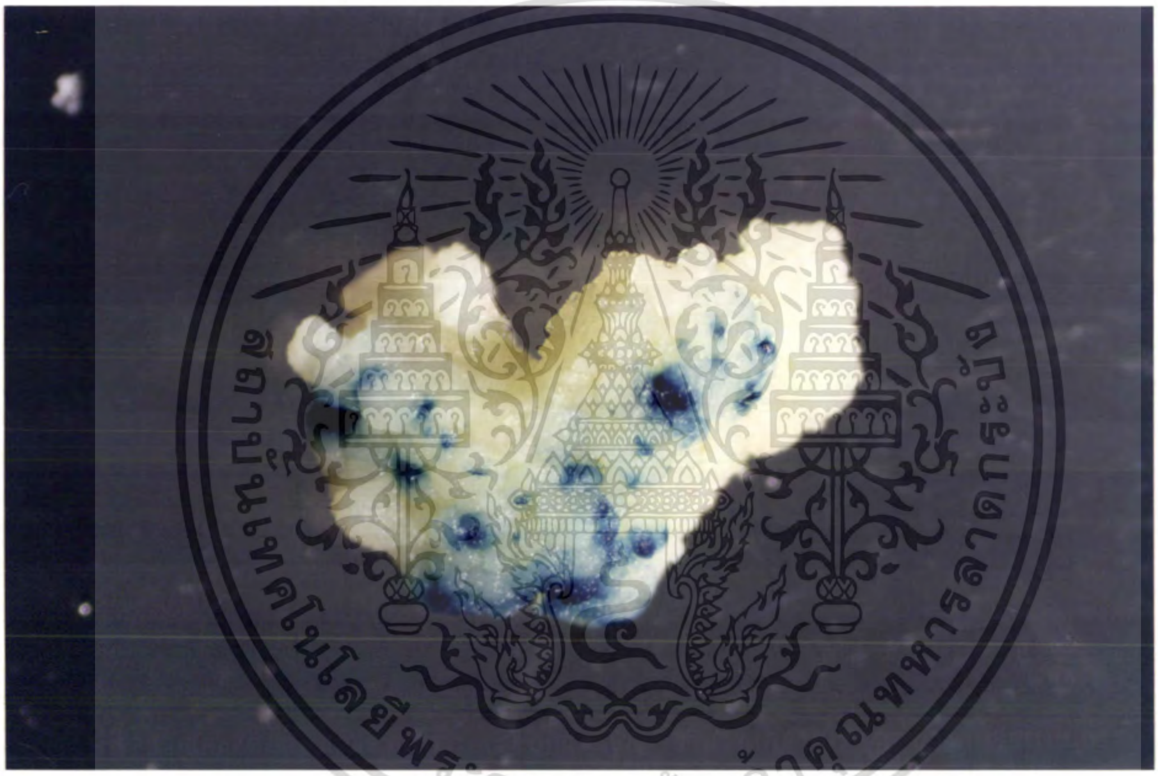
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 36 แสดงแคลลัสหลังจากการทดสอบกัสแอสเสเมื่อมองด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

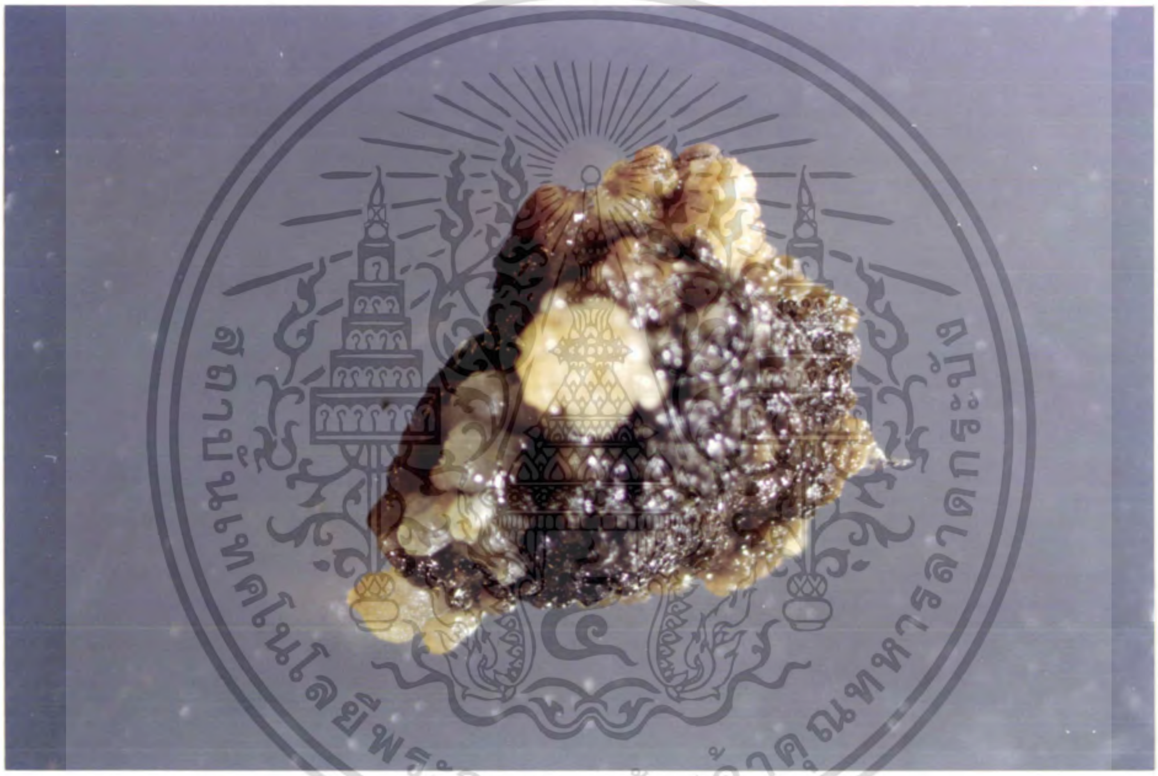
รูปที่ 37 แสดงแคลลัสหลังจากการทดสอบกัสแอสเสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



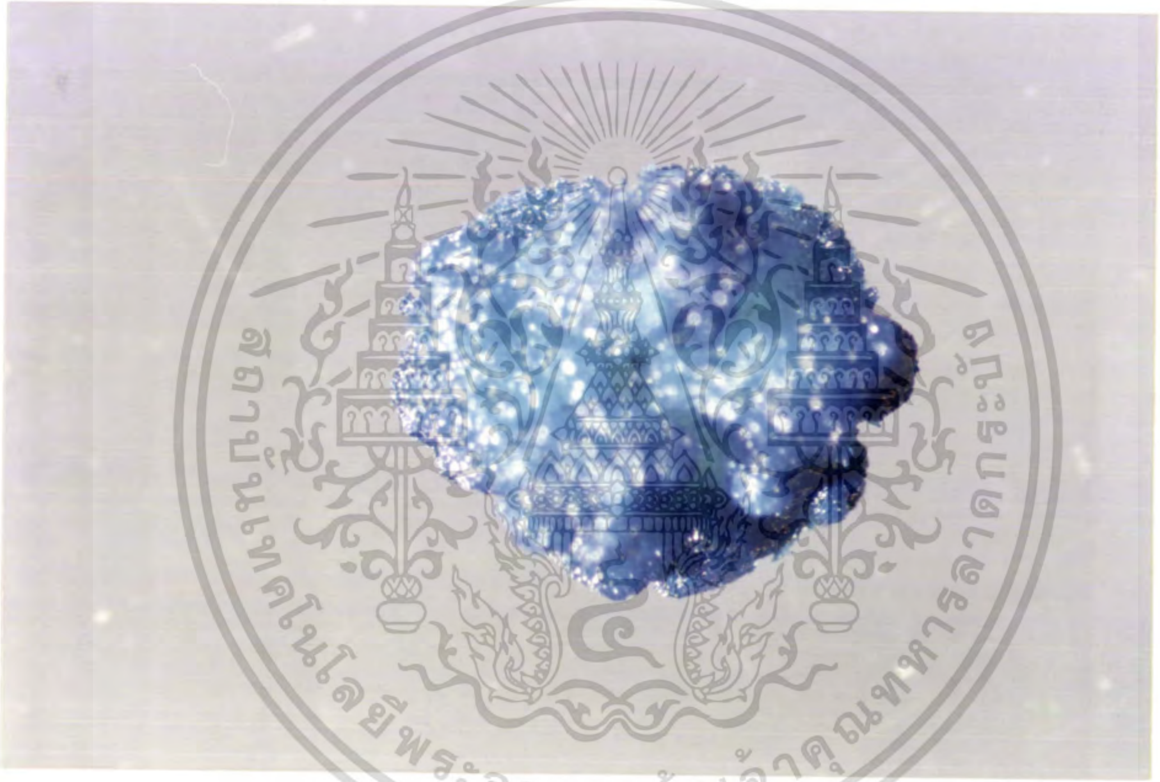
รูปที่ 38 แสดงแคลลัสหลังจากการทดสอบกัสแอสเสที่สามารถมองเห็นจุดสีฟ้าได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 39 แสดงแคลลัสขณะทำการคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 40 แสดงแคลลัสที่คัดเลือกได้หลังผ่านการถ่ายยีนแล้ว
เป็นเวลา 20 วันแล้วนำมาทดสอบกัสแอสเส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. ผลของสารบางชนิดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

จากผลการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาทพบว่า อาหารแต่ละชนิดที่มีปริมาณไคเนติน และ BAP ที่แตกต่างกันสามารถชักนำข้าวแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกันแม้แต่ในข้าวสายพันธุ์เดียวกัน การเพิ่มกรดอะมิโนบางชนิดเพียงเล็กน้อยก็ส่งผลให้เกิดการชักนำได้ต่างกัน

อาหารที่มีปริมาณออกซินแตกต่างกันพบว่าในอาหารที่ไม่มี NAA ปริมาณ 2,4-D ไม่สามารถส่งผลการชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 โดยสายพันธุ์เหลืองประทิว123 ให้ผลดีที่อาหารที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยไม่มี NAA ร่วมด้วยเพียงอาหารเดียวเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ขาวตาแห้ง17 ให้ผลต่ำมากในทุกๆอาหาร ส่วนสุพรรณบุรี 60 พบว่าถ้ามีปริมาณ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้แต่ก็ยังน้อยกว่าอาหารที่มี 2,4-D ร่วมกับ NAA และยังพบอีกว่าผลที่ได้จาก 2,4-D ร่วมกับ NAA ดีกว่าผลจาก 2,4-D อย่างเดียวโดยเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่างก็มีความเหมาะสมต่อสารอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันไปจึงมีการทดลองในอาหารที่ต่างกันตามชนิดของสายพันธุ์ข้าว ข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิวก็เช่นกัน จากการทดลองพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ได้ดีในอาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยไซโตไคนิน 0.5มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมแอลโพลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหารแข็งสูตร NB1 ที่ประกอบด้วยไซโตไคนิน 0.5มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมโพลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เซฟโฟแทกซึม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ขาวตาแห้งเหมาะสมต่อสูตรอาหารแข็งสูตร NB1 ประกอบด้วยแอลโพรลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เซฟโฟแทกซึม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 เหมาะสมต่อสูตรอาหารแข็ง NB1 ประกอบด้วยแอลโพลีน 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เซฟโฟแทกซึม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์เหลืองประทิวต้องการโพรลีนมากกว่าอีก 2 สายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ขาวตาแห้งไม่ต้องการโพรลีนเลย นอกจากนั้นสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ไม่เหมาะสมต่อเซโฟแทกซึมซึ่งต่างไปจากอีก 2 สายพันธุ์ที่ต้องการเซฟโฟแทกซึม

จากการศึกษาแนวโน้มการใช้ 3,4-D แทน 2,4-D พบว่าข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความเหมาะสมต่อการใช้ 3,4-D ในอาหารที่มีโพรลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณแอลโพรลีนเป็น 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตรผลที่ได้น้อยกว่าการใช้แอลโพรลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเล็กน้อยในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 แต่ให้ผลที่ดีกว่ามากในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การชักนำให้เกิดการงอกใหม่

ในการชักนำให้เกิดการงอกใหม่จะเห็นได้ว่าถ้าเราเพิ่มความเครียดของน้ำให้มีมากขึ้นจะทำให้ความถี่ของการชักนำการงอกใหม่ดีขึ้น ดังนั้นเราควรจะเลือกการที่ประกอบด้วย ไฟทาเจล 6 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหารชักนำการงอกใหม่ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการที่ประกอบด้วยกรดแอบไซซิคและฮอร์โมนจิบเบอเลลลินไม่สามารถชักนำให้เกิดการงอกใหม่ได้ดีขึ้น ขณะที่การที่ประกอบด้วยฮอร์โมนไซโตไคนินที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลให้มีความถี่ของการชักนำการงอกใหม่สูงสุด (30 เปอร์เซ็นต์) สำหรับข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 การที่ประกอบด้วยฮอร์โมนไซโตไคนิน จะให้ผลดีต่อความถี่ของการชักนำการงอกใหม่เพียงเล็กน้อย(น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่การที่ประกอบด้วยกรดแอบไซซิคเพียงชนิดเดียว จะสามารถเพิ่มความถี่ของการชักนำการงอกใหม่ได้สูงสุดถึง 22.37 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท พบว่าการทดลองที่ใช้ไม่สามารถจะสามารถชักนำให้เกิดการงอกใหม่ได้

ส่วนการชักนำให้เกิดระบบรากโดยใช้ NAA นั้นพบว่าการที่ประกอบด้วย NAA ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้ระบบรากมีการพัฒนาในระดับที่ดีมากแม้ว่าพืช ที่นำมาชักนำจะมาจากการชักนำให้เกิดการงอกใหม่โดยใช้อาหารต่างๆ กันแต่ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน

3. การถ่ายยีน

ความเข้มข้นที่ใช้ในการถ่ายยีน จะเห็นได้ว่าในขาวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 สามารถเลือกใช้สารละลายเซลล์ได้ในแทบทุกความเข้มข้นโดยเฉพาะที่ค่าความดูดกลืนแสงที่ 0.1 ส่วนในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 ก็สามารถเลือกใช้ได้ทุกค่าความดูดกลืนแสง โดยเฉพาะที่ค่าความดูดกลืนแสงที่ 0.01 สำหรับข้าวสายพันธุ์ชัยนาท พบว่าสามารถถ่ายยีนได้โดยใช้ค่าความดูดกลืนแสงที่ 0.001 เท่านั้น

อายุที่เหมาะสมในการถ่ายยีนของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และชัยนาทอยู่ในช่วง 7-11 วันเป็นช่วงที่แคลลัสยังมีอายุน้อยผนังเซลล์บางทำการถ่ายยีนได้ง่าย ซึ่งอายุที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าว และ อัตราการเจริญเติบโตของแต่ละเมล็ดด้วย

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วม (co-culture medium) มีผลกับประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 NB1+AS เหมาะสมที่สุด ขาวตาแห้ง 17 NB4+AS เหมาะสมที่สุด และสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 NB1+ASและ NB5+AS เหมาะสมที่สุด

ความถี่ของการถ่ายยีนไม่มีความแตกต่างกันมากนักเมื่อใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ทั้ง 3 สายพันธุ์ EHA 105 PCAMBIA(1301) LBA4404 PCAMBIA(1301) และ AGL1 PCAMBIA(1301) EHA 105 PCAMBIA(1301) LBA4404 PCAMBIA(1301) และ AGL1 PCAMBIA(1301) จึงสรุปได้เพียงแต่ว่าใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถถ่ายยีนได้

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่มีลิขสิทธิ์ ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่... ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากทำการถ่ายยีนแล้วจะทำการคัดเลือกโดยใช้ไฮโกรมัยซินซึ่ง ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกจะโตขึ้นมาใหม่มีรูปร่างกลม (gloubular shape) หลังจากที่เซลล์ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธิดารัตน์ ศรีคัฒนพรหม. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโปรตีนสูงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.(2533)

ประภา ศรีพิจิตต์. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยาสารเกษตรศาสตร์(วิทย.) 28 (2532) : 324-330.

ประภา ศรีพิจิตต์. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์. เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่องเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2536): 17-28.

ประภา ศรีพิจิตต์และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม.การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryzae sativa* L.) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105.วิทยาสารเกษตรศาสตร์(วิทย.) 28 (2537) : 27-37.

เผดิม ระติสุนทร. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าวพันธุ์ต่างๆ .วิทยาสารเกษตรศาสตร์(วิทย.) 27 (2536) :255-278.

วิชัย โฆสิตรัตน. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 8 (2538) : 9-11.

สนธิชัย จันทร์เปรม,ชัยกฤษ์ มณีพงษ์และอรดี สหวัชรินทร์. การคัดข้าวทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร,. *ใน*รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 23 สาขาพืช.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน,กรุงเทพฯ (2528) :1-10.

สุพรรณี แก่นสาร. ผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนในข้าว.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ (2532)

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น, ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ (2526) :186-204.

อุดม นวพานิชย์ และ อรดี สหวัชรินทร์. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว.*ใน*เรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 18 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ,กรุงเทพฯ (2523) :17.

Abel,T. and Y.Futsuhara. Efficient plant regeneration by embryogenesis from root callus tissue of rice (*Oryza sativa L.*) J. Plant Phisiol.121 (1985):111-118.

Armstrong,C.L.and C.E.Green. Establishment and maintenance of friable embryogenesis maize callus and the involement of L-proline. Planta 164 (1985) : 207-214.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Boissot,N.,M.Valdez and E.Guiderdoni. Plant regeneration from leaf and seed-derived calli and suspension cultures of the African perrenial wild rice, *Oryza longistaninata.* Plant Cell Reports 9 (1990): 247-250.

Chan,M.T.,H.H.Chang,S.L.Ho,W.F.Tong and S.M.Yu.Agrobacterium-medaited production of transgenic rice plants expressing a chimeric α-amylase promoter / β-glucoronidase gene. Plant Mol.Biol. 22 (1993) : 491-506.

Chan, MT.,Hsin-Hsiung, C., Shin-Lon, H., Wu-Fu, T., and Su-May, Y. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α-amylase promoter / β-glucuronidase gene . Plant Molecular Biology 22 (1993) : 491-506.

Chan, M.T.,T.M.Lee and H.H.Chang. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.Plant Cell Physiol. 33 (1992) : 577-583.

Chan, MT., Tse-Min, L., and Hsin-Hsiung, C. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by *Agrobacterium tumerfaciens*. Plant Cell Physiol 33(1992) : 577-583.

Chowdhry,C.N.,A.K.Tyagi, N.Maheshwari and S.C. Maheshwari. Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.cv. Pusa 169). Plant Cell,Tissue and Organ Culture 1993. 32 : 357-361.

Chu,C.C.,C.S., Wang,C.S.Sun,C.Hsu,K.C.Yin,C.Y.Chy and F.Y.Bi. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci.Sinica. 18 (1975) : 959-668.

Cornejo-Martin , M.J. and E.Primo-Millo. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.) Euphytica 30 (1981) : 541-546.

Datta,S.K.,A.Peterhaus,K.Datta and I.Potrykus. Genetically engineered fertile indica rice recovered from protoplasts. Bio/technology 8 (1990) : 736-740.

Dekeyser,R.,B.Claes,M.Marichal,M.Van Montagu and A.Caplan. Evaluation of selectable markers for rice transformation. Plant Physiol. 90 (1989) : 217-223.

Dekeyser,R.A.,B.Claes,M.Marichal,M.Van Montagu and A.Caplan. Transient gene expression in intact organized rice tissue. Plant Cell. 2 (1989) : 591-602.

Dun-Yi, and A.D.Krikorian. Multiplication of rice (*Oryza sativa* L.) from aseptically culture nodes.Ann.Bot. 48 (1981) : 255-259.

Elumalai Sivamani, Ping Shen, Natacha Oplka, Roger N. Beachy, and Claude M. Fauquet. Selection of quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. Plant cell Reports.15(1996) :322-327.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genovesi,A.D.and C.W.Magill. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. 19 (1979): 622-664.

Hamid Rashid, Shuuji Yokoi, Kinya Toriyama, and Kokichi Hinata. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium in Indica* rice. Plant cell Reports .15 (1996) :727-730

Hartke,S.and H. Lorz. Somatic embryogenesis and plant regeneration from various indica rice genotype (*Oryza sativa* L.) J.Genet.Breed. 43 (1989) : 205-214.

Hayashimoto,A.,Z.Li and N. Murai. A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for production of ferrtile transgenic rice plants. Plant Physiol.93 (1990):857-863.

Hiei,Y., Shozo, O., Toshihiko, K., and Takashi, K. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant Journal . 6 (1994) : 271-282.

Hiei,Y.,S.Ohta,T.Komari and T.Kumashiro. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.). mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J.6 (1994) : 271-282.

Hooykaas-Van Slongteren,G.M.S.,P.J.J.Hooykaas and R.Schilperoort. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. Nature .311 (1984) : 763-764.

Hiroyuki Fukuoka. Molecular chain of organelle DNA sequences in rice through dedifferentation, long-term culture, or the morphogenesis process. Plant Molecular Biology . 26 (1994) : 399-907.

Koki Yoshida.Evidence for the involvement of glycanase activities in the dissociation of cortical cell walls during the emergence of callus from rice root tissues in the presence of 2,4-D. Plant Cell Report .15 (1995) :43-50.

Lee,N.,Y. Wang,J.Yang,K.Ge,S.Huang,J.Tan and D.Testa. Efficient transformation and regeneration of rice small cell groups. Proc.Nalt.Acad.Sci.USA. 88 (1991) : 6389-6393.

Li, X.Q., Chang-Nong, L., Steven, W.R., Jian-ying, P., Stanton, B.G., and Thomas, K.H.1992 . Factors Influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gusA* in rice . Plant molecular Biology .20 (1995) : 1037-1048.

Li,X.Q.,C.N. Liu,S.W.Ritichie,J.Y.Peng,S.B.Gelvin and T.K.Hodges. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gus* A in rice. Plant Mol Biol. 20 (1992) : 1037-1048.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ming-Tsair Chan และคณะ . Transformation of indica rice (*Oryza Saltiva* L.). Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* . Plant Cell Physial. 33(5) (1992) :577-583.

Ozawa,K. and A. Kamamine. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl.Genet. 77 (1989) : 205-211.

Peng,J.,h.Konowicz and T.K.Hodges. Transgenic indica rice plants. Theor.Appl.Genet. 83 (1992) : 855-863.

Peng,J.,L.A.Lyznik,L.Lee and T.K.Hodges. Co-transformation of indica rice protoplasts with *gus* A and *neo* genes. Plant Cell Reports . 9 (1990) : 168-172.

P.J.Davies และคณะ Plant Hormones . 4-10 (1995) : 778-784.

Potrykus,I,M.W.Saul,J.Paszkowshi and R.D.Sillito. Direct gene transfer yo cells of a graminaceous monocot. Mol.Gen.Genet. 199 (1985) : 183-188.

Raineri,D.M.,P.Bottino,M.P.Gordon and W.Nester. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). Bio/Technology . 8 (1990) : 33-38.

Rashid, H., Shuuji, Y., Kinya, T., and Kokichi, H. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. Plant Cell Reports . 15 (1996) : 727-730.

Rueb,S.,M.Leneman,R.A.Schlperoort and L.A.M.Hensgens. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). Plant Cell,Tissue and Organ Culture . 36 (1994) : 259-264.

Seiichi Toki, Rapid and Efficient *Agrobacterium*- mediated transformation in rice . Genetic Resource. (1997) :16-21.

Sivamani,E.,P.Shen,C.A.Ong,G.Hamidah,M.D.Hassan, M.T.Mohamed Senawi,R.N.Beachy and C.M.Fauquet. Biological screening and analysis of transgenic rice lines expressing coat protein(s) of rice tungro spherical virus (RTSV) in greenhouse trials. Third International Rice Genetic Symposium 16-20 Oct. (1995) Manila, The Philippines.(abs.)

Sheng, J., and Vitaly. C. Agrobacterium-plant cell DNA transport : have virulence protiens, will travel. The Plant Cell . 8 (1996) : 1699-1710.

Shipins Zhans,Lili Chen,Rongda Qu, Philippe Marmeu,Roger Beachy,and Claude Fauquet.Regenerate of fertile transgenic indica (group1) rice plant following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells.Plant Cell Reports.15 (1996) :465-469.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tada,Y.M.Sakamoto and T.Fujimura. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants : use of electroporation buffer lacking chloride ions. Theor.Appl.Genet. 80 (1990) : 475-480.

Toriyama,K.,Y.Arimoto,H.Uchimiya and K.Hinatn. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts.Bio/Technology . 6 (1988) : 1072-1074.

Uchimiya, H.,T.Fushimi, H.Hashimoto,H.Harada,K.Syono and Y.Sugawara. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplaast of rice (*Oryza sativa* L.). Mol.Gen.Genet. 204 (1986) : 204-207.

Vajrabhaya,M.,T.Tunvachkul and T.Vajabhaya. Effect of auxin and cytokinin of plant regeneration from rice callus.J.Sci.Res.Chula.Univ. 11 (1986) : 113-115.

Vajrabhaya,M.,T.Thanapaisal and T.Vajabhaya. Development of salt tolerent lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture. Plant Cell Reports . 8 (1989) : 411-414.

Vasil V.and I.K. Vasil. Plant regeneration from friable embryogenesis callus and cell suspension cultures of *Zea may* L.J.Plant Physiol. 124 (1986) : 399-408.

Wang,M.S.,F.J.Zapata and D.C.De Castro. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young in fluorescence of wild rice (*Oraza perennis* Moench). Plant cell Reports . 6 (1987) :294-296

Wu,L. and H.W.Li. Introduction of callus tissues initiation from different somatic organs of plant by various concentration of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. Cytologia . 36 (1970) : 411-416.

Xu,X. and B.Li. Fertile transgenic indica rice plants obtained by electroporation of yhe seed embryo cells. Plant Cell Reports .13 (1994) : 237-242.

Xu,Y.,W.Bu and B.Li. Metabolic factor capable of inducing *Agrobacterim* vir gene expression are present in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports. 12 (1993) : 160-164.

Yang,H.,H.M.Zhang,M.R.Davey,B.J.Mulligan and E.C. Coeking. Production of kanamycin resistant rice tissue follwing DNA uptake into protoplasts. Plant Cell Reports . 7 (1988) : 421-425.

Yatazawa,m.,k.Furuhashi and m.Shimizu. Growth of callus tissue from rice-root in *vitro*.Plant Cell Physiol. 8 (1967) : 363-373.

Zhang,H.M.,H.Yang,E.L.Rech,T.J.Golds,A.S.Davis,B.J.Mulligon,Cocking and M.R.Davey. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplast. Plant Cell Reports . 7 (1988) : 379-384.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang,W.and R. Wu. Effficient regenerration of transgenic plants from rice pratoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. Theor.Appl.Genet. 76 (1988) : 835-840.

Zimmy,J.and H.Lorz. Plant regeneration and initiation of all suspension from root-tip derived callus of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell Reports. 5 (1986) : 89-92.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีทดสอบกัสแอสเส (GUS Assay)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนกัสในเซลล์ข้าว ทำโดยนำแคลลัสของข้าวมาแช่ในสารละลายเอ็กซ์กลักนำไปไว้ในระบบสูญญากาศเป็นเวลา 1-2 นาที จึงนำไปบ่มไว้เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเนื้อเยื่อของข้าวที่ผ่านการบ่มแล้วไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกไป จึงบันทึกผลโดยบันทึกจำนวนแคลลัสที่เปลี่ยนเป็นสีฟ้า

สารละลายเอ็กซ์กลักประกอบด้วย

phosphate buffer	50	มิลลิโมลาร์
X-gluc (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-glucuronide)	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
Triton X-100	0.5	เปอร์เซ็นต์
methanol	20	เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่1 แสดงสูตรอาหารแข็งสูตร NB1

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
สารละลาย D	KNO_3	2830
	$(NH_4)_2SO_4$	463
สารละลาย E	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	166
สารละลาย F	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185
	KH_2PO_4	460
B5 micronutrients	KI	0.75
	H_3BO_3	3
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
	$Na_2Mo_4 \cdot 7H_2O$	0.25
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
FeEDTA	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.8
B5Vitamins	Inositol	100
	Nicotinic acid	1
	Pyridoxine HCl	1
	Thiamine HCl	10
	2,4-D	2
	NAA	1
	Casien hydrolysate	300
	L-Proline	500
	Sucrose	30 กรัมต่อลิตร
	Phytagel	2.6 กรัมต่อลิตร
	pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่ 2</u> แสดงสูตรอาหารแข็ง NBKNB ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส

ชื่อ	NB1 ที่ประกอบด้วย	
	BAP(มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไคเนติน(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NBKNB3	1	1
NBKNB6	0.5	0.5
NBKNB7	0.25	0.25
NBKNB8	0	0

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงสูตรอาหารแข็ง MNB

NB1 ที่ประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
L-proline	500
Glutamate	500
Tryptophane	50
MES	500

<u>ตารางที่ 4</u> แสดงสูตรอาหารแข็ง NB ที่ความเข้มข้นฮอร์โมนออกซินต่างๆ

ชื่ออาหาร	2,4-D(มิลลิกรัมต่อลิตร)	NAA(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NB1	2	1
NB2	2	0
NB3	2.5	1
NB4	2.5	0
NB5	3	1
NB6	3	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงสูตรอาหารแข็ง AB ที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium sp.*

	สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
AB buffer	K_2HPO_4	1500
	NaH_2PO_4	200
AB salt	NH_4Cl	1000
	$MgSO_4.7H_2O$	300
	KCl	150
	$CaCl_2.2H_2O$	150
	$FeSO_4.7H_2O$	2.5
กานามัยซิน		50
วุ้น		15 กรัมต่อลิตร(1.5เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่ 6</u> แสดงสูตรอาหารเหลว AAM ที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium sp.*

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
AAmacronutrients	$Na_2HPO_4.2H_2O$	169.6
	$MgSO_4.7H_2O$	500
	KCl	150
	$CaCl_2$	150
AAmicronutrients	$MnSO_4.4H_2O$	10
	$NaMoO_4.2H_2O$	0.25
	H_3BO_3	3.0
	$ZnSO_4.7H_2O$	2.0
	$CuSO_4.5H_2O$	0.0387
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
	KI	0.75
AAiron	$FeSO_4.7H_2O$	28
AAAmino acid	glycine	7.5
	arginine	174
MSvitamine	Myo-inositol	100
	Nicotinicacid	0.5
	Thaimine	0.5
	Phyrimidine	0.5
Casaamino acid		500 มิลลิกรัมต่อลิตร
Sucrose		68.5 กรัมต่อลิตร
Glucose		35 กรัมต่อลิตร
Acetosyringone		100 ไมโครโมลาร์
pH		5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีในสูตรอาหาร Murashigae and Shoog (1996) :MS

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutrients	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	KH_2PO_4	170
Macronutrients	KI	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
	$NaMo_4.2H_2O$	0.25
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Vitamine	Inositol	100
	Nicotinic acid	0.5
	Pyridine HCL	0.5
	Thiamine HCL	0.1
Sucrose		10.0 กรัมต่อลิตร
pH		5.8

ตารางที่ 8 แสดงสูตรอาหารแข็งในการชักนำให้เกิดราก

Rooting Medium :RM

	ฮอร์โมน	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
1/4MS ที่ประกอบด้วย	NAA	1
	BAP	1
	ไฟทาเจล	3000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้