การเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าว
โดยใช้ *Agrobacterium*

T033517

นางสาวชุติมา ประเสริฐสินธุ์ 38054323
นายประชา กองสุข 38054339
นางสาวปัญจรีย์ คุมพล 38054342

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีการศึกษา 2541

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....33517
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Efficient Transformation in rice (*Oryza sativa* L.)

by *Agrobacterium*

Chutima Prasertsintu 38054323

Pracha Kongsuk 38054339

Punjaree Khumpon 38054342

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 Ladkrabang1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้ *Agrobacterium*

Efficient Transformation in rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium*

โดย นางสาวชุติมา ประเสริฐสินธุ์ รหัสประจำตัว 38054323
นายประชา กองสุข รหัสประจำตัว 38054339
นางสาวปัญจรีย์ คุมพล รหัสประจำตัว 38054342
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....
(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

.....
(อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้ *Agrobacterium*	
นักศึกษา	นางสาวชุติมา ประเสริฐสินธุ์	38054323
	นายประชา กองสุข	38054339
	นางสาวปัญจรีย์ คุมพล	38054342
อาจารย์ที่ปรึกษา	อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2541	

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในแคลลัสข้าว 4 สายพันธุ์ และเซลล์แขวนลอย 3 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 °C พบว่าข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 ชัยนาท และสุพรรณบุรี 90 ให้ผลการถ่ายยีนดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C ในเชื้อ EHA ที่อุณหภูมิ 25°C ในเชื้อ EHA ที่อุณหภูมิ 28°C ในเชื้อ EHA และที่อุณหภูมิ 25°C ในเชื้อ AGL-1 ตามลำดับ ส่วนการถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ และบาสมาติ ให้ผลการถ่ายยีนดีที่สุดที่อุณหภูมิที่ 25°C ในเชื้อ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28°C ในเชื้อ LBA และที่ 25°C ในเชื้อ EHA ตามลำดับ

ผลของฮอร์โมน kinetin และ NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสอายุ 7 วันของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 กข 6 กข 23 และนางมล สูตรอาหารที่เหมาะสมคือ NB_4 และ NB_7 สูตรอาหาร NB_6 สูตรอาหาร NB_1 สูตรอาหาร NB_{11} สูตรอาหาร NB_4 และสูตรอาหาร NB_6 กับ NB_{10} ตามลำดับ ผลของฮอร์โมน kinetin และ NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสอายุ 1 เดือนของข้าวสายพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 และขาวตาแห้ง สูตรอาหารที่เหมาะสมคือ NB_5 สูตรอาหาร NB_9 กับ NB_3 และสูตรอาหาร NB_8 ตามลำดับ

ผลของฮอร์โมน NAA และ BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในต้นข้าว 3 สายพันธุ์ ข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้งสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากคือ $^1/_4MS_{12}$ ข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากคือ $^1/_4MS_7$ และข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิวสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากคือ $^1/_4MS_4$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : Efficient Transformation in rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium*

Name : Miss Chutima Presertsintu 38054323

: Mr. Pracha Kongsuk 38054339

: Miss Punjaree Khumpon 38054342

Special Project Advisor : Anurug Poeaim

Academic : 1998

Abstract

From the studies about rice transformation by *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 EHA 105 and LBA 4404 on the callus of four kinds rice and three kinds of cell suspension at 25 and 28 $^{\circ}$ C. For Khao Dawk Mali , Supanburi 60, Chainat and Supanburi 90 should be transform at 25°C of EHA, 25°C of EHA, 28°C of EHA and 25°C of AGL-1, respectively. For cell suspension, Leuang Pra-Tew, Khao Dawk Mali and Basmati should be transform at 25°C of AGL-1, 28°C of LBA and 25°C of EHA, respectively.

The result of hormone kinetin and NAA for induced callus is 7 days of age. For Khao Dawk Mali, Supanburi 60, Supanburi 90, RD 6, RD 23 and Nangmol should be regenerate on NB_4 and NB_7 medium, NB_6 medium, NB_1 medium, NB_{11} medium, NB_4 medium and NB_{10} medium, respectively. The result of hormone kinetin and NAA for induced callus is 1 month of age. For Khao Dawk Mali, Supanburi 60 and Khao TA Hang should be regenerate on NB_5 medium, NB_9 and NB_3 medium and NB_8 medium, respectively.

The result of hormone NAA and BAP to root induction. For Khao TA Hang is suitable for induce root system on $^1/_4MS_{12}$ medium, Supanburi 60 is suitable for induce root system on $^1/_4MS_7$ medium and Leuang Pra-Tew is suitable for induce root system on $^1/_4MS_4$ medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการ อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการ อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ในความกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ในการศึกษาวิจัยและตรวจแก้ปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน

ขอกราบขอบพระคุณ พี่ๆปริญญาโท เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อพิเศษภาคภาษาไทย	ก
บทคัดย่อพิเศษภาคภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
- ที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	32
1. การถ่ายยีน	32
1.1 การศึกษาถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในแคลลัสของข้าว 4 สายพันธุ์	32
1.2 การศึกษาถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยเชื้อ *A. tumefaciens* ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์แขวนลอยของข้าว 3 สายพันธุ์	38
2. ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่	44
2.1 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสที่มีอายุ 7 วัน ในข้าว 6 สายพันธุ์	45
2.2 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสที่มีอายุ 1 เดือน ในข้าว 3 สายพันธุ์	52
3. ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าว 3 สายพันธุ์	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 61
1. การถ่ายยีน 61
2. ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ 62
3. ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในการชักนำให้เกิดราก 63
เอกสารอ้างอิง 65
ภาคผนวก 69
ภาคผนวก ก 69
ภาคผนวก ข 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 32

2 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 34

3 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 35

4 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 37

5 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 38

6 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 41

7 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลลอยของข้าวสายพันธุ์บาสมาติ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 43

8 แสดงสูตรอาหาร 12 สูตรที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมน 2 ชนิดคือ ฮอร์โมน kinetin และ NAA เพื่อนำสูตรอาหารนั้นมาศึกษาว่าสูตรอาหารใดที่ทำให้การชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด 44

9 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ (แคลลัสอายุ 7 วัน) 45

10 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ตารางที่

11 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 47
12 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 6 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 48
13 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 23 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 49
14 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์นางมล (แคลลัสอายุ 7 วัน) 50
15 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง (แคลลัสอายุ 1 เดือน) 52
16 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (แคลลัสอายุ 1 เดือน) 53
17 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ (แคลลัสอายุ 1 เดือน) 54
18 แสดงสูตรอาหาร 12 สูตรที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมน
2 ชนิดคือ ฮอร์โมน NAA และ BAP เพื่อนำสูตรอาหารนั้นมา
ศึกษาว่าสูตรอาหารใดที่ทำให้การชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด 56
19 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 56
20 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 57
21 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ภาพจำลองการยึดเกาะของ *A. tumefaciens*	18
2	แสดงขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *Agrobacterium*	27
3	แสดงขั้นตอนการหยดเชื้อ *Agrobacterium*	28
4	แสดงขั้นตอนการล้างเชื้อ *Agrobacterium*	29
5	แสดงผลของการถ่ายยีนตรวจสอบโดยกล้องสเตอริโอ	33
6	แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส	33
7	แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส	35
8	แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส	36
9	แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส	38
10	แสดงการถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอย	40
11	แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส	41
12	แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่

13 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์บาสมาติ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส 44

14 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ (แคลลัสอายุ 7 วัน) 45

15 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 46

16 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 47

17 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 6 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 48

18 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 23 (แคลลัสอายุ 7 วัน) 49

19 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์นางมล (แคลลัสอายุ 7 วัน) 50

20 แสดงการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสอายุ 7 วัน 51

21 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง (แคลลัสอายุ 1 เดือน) 52

22 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (แคลลัสอายุ 1 เดือน) 53

23 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ (แคลลัสอายุ 1 เดือน) 54

24 แสดงการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสอายุ 1 เดือน 55

25 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 57

26 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 58

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำ
ให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 59
28 แสดงการชักนำให้เกิดราก 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เป็นอาหารหลักประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลก สำหรับประเทศไทยถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ มีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทยอย่างมาก การนำพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อผลิตข้าวสายพันธุ์ใหม่จากการถ่ายยีน มีรายงานการถ่ายโอนยีนในข้าว ซึ่งพบว่ามีการใช้วิธีต่าง ๆ ได้แก่ การถ่ายโอนยีนโดยใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG) หรือใช้เครื่องมือ electroporation โดยใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการถ่ายยีนให้โปรโตพลาสต์และการถ่ายยีน (microprojectile bombardment) เข้าสู่ embryoge-nic calli (Toriyama และคณะ 1988, Datta และคณะ 1990, Christou และคณะ 1991, Peng และคณะ 1992, Ghosh Biswas และคณะ 1994, Zhang 1995 และ Sivamani และคณะ 1996) การใช้ microprojectile bombardment สำหรับการถ่ายยีนในข้าว พบว่ามีประสิทธิภาพค่อนข้างดีกว่าวิธีอื่น แต่ค่าใช้จ่ายสำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ค่อนข้างสูง และให้ประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากยีนที่ต้องการจะเข้าไปในยีนพืชมากกว่าหนึ่งยีน ทำให้เกิดลักษณะการกลายพันธุ์สูง มีผลให้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนทำได้ยากลำบาก การใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นตัวกลางในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว เป็นเทคนิคการถ่ายยีนที่สำคัญอีกวิธีหนึ่ง มีรายงานการว่าประสบความสำเร็จในข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น (Japanica rice) (Raineri และคณะ 1990) และสายพันธุ์ข้าวอินเดีย (Indica rice) (Chan และคณะ 1992) และมีการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน (scutella) ซึ่งจะให้ผลตอบสนองที่ดีในการถ่ายโอนยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม (Hiei และคณะ 1997)

จากการศึกษารายงานการทดลองในปัจจุบันพบว่า วิธีถ่ายโอนยีนที่เหมาะสมและเกิดประโยชน์กับประเทศไทยเราซึ่งเป็นประเทศที่กำลังพัฒนาคือ การถ่ายโอนยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม และศึกษาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายโอนยีนโดยหายีนพาหะ และการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่หลังจากการถ่ายโอนยีน เป็นสิ่งที่สำคัญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของเชื้อ *Agrobacterium* สำหรับการถ่ายยีน
2. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน หลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์

ขอบเขตการวิจัย

การเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ของข้าวให้เกิดเป็นแคลลัส เพิ่มประสิทธิภาพชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นแล้วย้ายออกปลูก เพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายโดยใช้ *Agrobacterium tumerfaciens* ในแคลลัสชักนำให้กลายเป็นต้น แล้วตรวจสอบการแสดงออกของโปรโมเตอร์ยีนหลังจากการถ่ายโอนยีนเข้าไปในเซลล์ หาวิธีที่เหมาะสมในการย้ายต้นอ่อนออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จะเป็นส่วนหนึ่งที่มีแหล่ง ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ในแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์ข้าว
2. การวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช ช่วยสานต่องานทางด้านพันธุวิศวกรรมให้ครบวงจร สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดของประเทศไทยมาช้านาน นอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารหลักประจำวันของคนไทยแล้ว ยังเป็นสินค้าออกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งด้วย ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ดีขึ้นเป็นลำดับ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวนาสวนในประเทศไทย เท่าที่ปรากฏเป็นหลักฐาน เริ่มขึ้นในปลายรัชสมัยพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว มีการประกวดพันธุ์ข้าวเป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2450 ที่เมืองธัญบุรี ครั้งที่สองได้จัดขึ้นในปีต่อมาที่วัดสุทัศน์เทพวราราม กรุงเทพฯ และต่อมามีการประกวดพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพเมล็ดดีตามความต้องการของตลาดต่างประเทศ (สุวิตร, 2525) หลังจากนั้น ข้าวไทยก็ได้มีการปรับปรุงและพัฒนาดีขึ้นเป็นลำดับ จึงกล่าวได้ว่า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2460 ข้าวไทยมีคุณภาพดีจนเป็นที่ต้องการของตลาดโลก จนกระทั่งปัจจุบันนี้ ข้าวไทยก็ยังคงรักษาชื่อเสียงนี้ไว้ได้ และนับวันความต้องการของตลาดก็เพิ่มมากขึ้นทุกปี วิธีการนำมาซึ่งคุณภาพที่ดีและผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง งานปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงก้าวต่อไปอย่างไม่หยุดยั้ง แม้ว่าปัจจุบันประเทศไทยจะมีข้าวพันธุ์ใหม่ ๆ ที่ทางราชการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพิ่มมากขึ้น แต่พันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ก็มีข้อดีข้อเสีย แตกต่างกันมากบ้างน้อยบ้าง ซึ่งจะต้องหาแนวทางแก้ไขต่อไป

ข้าวเป็นพืชผสมตัวเองโดยธรรมชาติ จึงนับได้ว่ามีความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างเชื่องช้า ทั้งนี้เพราะลักษณะทางพันธุกรรมของพืชแต่ละต้น จะอยู่ในสภาพคงตัว (homozygosity) และด้วยเหตุนี้ การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะเกิดขึ้นได้บ้างเพียงเล็กน้อย ในสภาพธรรมชาติ ฉะนั้นการที่จะรอให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมตามธรรมชาติ ย่อมต้องอาศัยเวลาและอาจเป็นไปในแนวทางที่ไม่ต้องการ แต่ในการเลือกพันธุ์ข้าวใดมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์นั้น จะต้องมีความผันแปรภายในประชากรอยู่พอสมควร ซึ่งข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีคุณลักษณะดังกล่าว (สุพรรณี, 2532)

ประพาส (2531) และ อรรควุฒิ (2526) ได้กล่าวถึงข้าวไว้ว่า ข้าวเป็นพืชล้มลุก ใบเลี้ยงเดี่ยว ในกระกูลหญ้า (Gramineae Family) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดชนิดหนึ่ง แบ่งข้าวได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาข้าวชนิดต่าง ๆ พบว่าข้าวพวก *Oryza sativa* ยังแบ่งได้แบ่ง 3 กลุ่ม คือ อินดิคา จาปอนิคา และจาวานิคา (Javanica) โดยยึดเอาลักษณะภายนอกของต้น เมล็ด และเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว เป็นเกณฑ์ในการแบ่ง

อินดิคา เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ต้นสูงและอ่อน มีใบกว้างสีเขียวอ่อน แตกกอมาก ให้ผลผลิตต่ำ มีการตอบสนองต่อปุ๋ยน้อย แต่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ง่าย 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 ที่ถ่ายเข้าไป ไม่จำเป็นต้องถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์ แต่พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ในข้าวพวกอินดิคา ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำมาก เมื่อเทียบกับข้าวจาปอนิคา หรือพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่น ๆ

สำหรับงานทดลองนี้ เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าว โดยการใช้ *Agrobacterium* ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับ *Agrobacterium* ในการย้ายยีน เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการถ่ายยีนที่เป็นประโยชน์ต่อไป

ซึ่งความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น จะขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่จะมีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช พอสรุปได้ดังนี้ (ไพบูลย์, 2524)

1. ปัจจัยภายในพืช

1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (endogenous factor) คือการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ไปเป็นยอดหรือรากนั้นขึ้นกับชนิดของพืช พืชบางชนิดอาจเกิดเป็นรากและยอดได้ง่าย ในขณะที่พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดได้ยาก แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตภายในพืช (homones) ในชิ้นส่วนของพืช ฮอร์โมนบางชนิดอาจจะช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และฮอร์โมนบางชนิดก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นกัน

2. ปัจจัยภายนอก

2.1 แสง (light) เชื่อกันว่าการใช้แสงในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่ได้มีจุดประสงค์เพื่อใช้แสงในการปรุงอาหาร แต่เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชมากกว่า ซึ่งการให้แสงแก่เนื้อเยื่อ ควรพิจารณาดังนี้

2.1.1 คุณภาพของแสง (light quality) จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง และแสงสีน้ำเงิน มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดที่นำมาเลี้ยง ในขณะที่แสงฟาร์เรดจะไปยับยั้งการเกิดยอด

2.1.2 ความเข้มของแสง (light intensity) พบว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ความเข้มแสงระดับต่าง ๆ กันมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

2.1.3 ระยะเวลาในการให้แสง (light duration) โดยทั่วไปมักจะให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชประมาณ 16 ชั่วโมง และมีช่วงมืด 8 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลดีในการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

2.2 อุณหภูมิ (temperature) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่ว ๆ ไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) Miller และ Skoog พบว่าการเกิดเป็นต้น ราก และแคลลัสของพืชแต่ละชนิดนั้น ขึ้นกับความสมดุลของปริมาณออกซิน และไซโตไคนินในอาหาร

3. ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่

3.1 ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง

3.2 สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3 ส่วนประกอบของอาหาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

ในปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เพราะชิ้นส่วนของต้นข้าวเกือบทุกส่วน สามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงให้สร้างแคลลัสได้ เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ตามที่ต้องการ มีการทดลองชักนำแคลลัสจากหลายส่วนของข้าว เช่น ลำต้น (Dun-Yi และ Krikorian, 1981; Wu และ Li, 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;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Comejo-Martin และ Primo-Millo, 1981; อุดม และ อรดี, 2523; สนธิชัย และคณะ, 2528) และดัพภะ (Hartke และ Lorz, 1989; Vajrabhaya และคณะ, 1989; Boissot และคณะ, 1990; ประภา, 2532) ประสบผลสำเร็จทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวให้ได้ผลดียิ่งขึ้น สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวไทยได้มีพัฒนาการมาเป็นลำดับ เนื่องจากข้าวไทยเป็นข้าวชนิดอินดิคา ซึ่งมีรายงานว่ามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนต่ำกว่าข้าวชนิดจาปานิคา ขั้นตอนสำคัญคือ การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ โดยมีความพยายามที่จะเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นให้สูงขึ้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่ว ๆ ไป เป็นเทคนิคที่เอาส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช ได้แก่ เซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะหรือโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีชีวิตมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ แสงและความชื้น (อรดี, 2522) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวจะประสบผลสำเร็จมากหรือน้อย นอกจากจะเกี่ยวข้องกับสูตรอาหาร ปัจจัยภายในชิ้นส่วนพืช และปัจจัยภายนอกแล้ว ความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซินและไซโตไคนิน ก็มีผลต่อเนื้อเยื่อมาก สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองกลุ่มมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. ออกซิน (auxin)

ออกซินเป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ ที่มีอัตราส่วนของไฮโดรเจนและออกซิเจนแตกต่างกันตามชนิดของออกซิน บางชนิดอาจมีไนโตรเจนหรือคลอรีนเป็นองค์ประกอบ สารที่แสดงคุณสมบัติเป็นออกซินมีดังนี้ indoleacetic acid (IAA) indolepropionic acid (IPA) indolebutyric acid (IBA) naphthaleneacetic acid (NAA) naphtoxyacetic acid (NOA) 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) 2,4,6-trichlorobenzoic acid (2,4,6-TBA) 2,3,6-trichlorobenzoic acid (2,3,6-TBA) และ 4-amino-3,5,6-trichlorobenzecic acid (สมศักดิ์, 2531)

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยช่วยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส
2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิค
3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดราก เป็นขั้นตอนที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของออกซินภายในต้นกับสภาพแวดล้อม ถ้าออกซินภายในต้นมีระดับต่ำ ก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อการเกิดรากที่สมบูรณ์ (สมศักดิ์, 2531)

2. ไซโตไคนิน (cytokinin)

ไซโตไคนิน เป็นฮอร์โมนพืชอีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ การควบคุมการสร้างอวัยวะ สารไซโตไคนินในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพวกอนุพันธุ์ของ 6-amino-purine สารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธุ์ของ 6-amino-purine ก็สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคนินได้อย่างดีเช่นกัน เช่น kinetin 6-benzyl-amino-purine (6 BAP) แต่สารสังเคราะห์บางตัวก็ไม่แสดงคุณสมบัติการเป็นไซโตไคนินเลย เช่น 6-dimethyl-amino-purine และ 2-dimethyl-amino-6 hydroxy-purine ปกติเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฮอร์โมนออกซินอยู่ด้วย เมื่อใส่ฮอร์โมนไซโตไคนินเข้าไป จะช่วยให้มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (พรทิพย์, 2528)

ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนิน โดยจะเกิดในบริเวณปลายราก และคัพภะที่กำลังพัฒนา มีผลต่อพืชดังนี้

1. ชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขณะที่มีออกซินด้วย และยังชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในพืชที่กำลังเป็นโรคปุ่มปมด้วย
2. ช่วยให้มีการงอกของหน่อเกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและในปุ่มปม และชักนำให้มีการแตกหน่อ

Vajrahaya และคณะ (1986) ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนิน ต่อการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของข้าว 2 พันธุ์ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข 23 ทดลองโดยใช้สูตรอาหาร 6 สูตร ที่มีส่วนผสมของ IAA kinetin และ BAP ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และมีสูตรอาหารเดิมที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรเปรียบเทียบ เนื่องจากเป็นสูตรที่ได้รับการทดสอบมาก่อนหน้านี้แล้วว่า ให้ผลดีในการชักนำให้เกิดต้นในข้าว ทั้งพันธุ์ที่ชักนำให้เกิดต้นได้ยากและง่าย ผลการทดลองปรากฏว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดต้นได้ดีบนอาหารสูตร F ซึ่งเติมไคเนตินความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนข้าวพันธุ์ กข 23 เกิดต้นได้ดีบนอาหารสูตรที่เติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรดจิบเบอเรลลิกสังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก ในเนื้อเยื่อของหน่อที่กำลังงอก และคัพภะที่มีการพัฒนาเกิดขึ้น กรดจิบเบอเรลลิกจะมีการเคลื่อนย้ายผ่านท่อและท่ออาหาร และมีผลต่อพืชดังนี้

1. กรดจิบเบอเรลลิกเป็นสาเหตุให้เกิดการขยายตัวของลำต้นที่มีความสูงมาก ๆ โดยจะไปกระตุ้นทั้งการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ชักนำให้เมล็ดมีการงอกในบางเมล็ดที่ปกติ แล้วจะต้องมีความเย็นและแสง เพื่อชักนำให้เกิดการงอก
3. กระตุ้นให้มีการผลิตเอ็นไซม์จำนวนมาก โดยเฉพาะแอลฟาอะไมเลส ในพืชที่มีการงอก

P.J. Davies และคณะ (1995) ได้กล่าวถึงออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน กรดแอบไซซิก ไว้ดังนี้

ออกซินปกติจะพบในรูปของกรดอินดอล-3-อซิติก เป็นหลักในพืชทุกชนิด ซึ่งไอเอเอผลิตจากทริปโตเฟนหรืออินโดล ในใบที่กำลังงอก ใบอ่อน และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาให้มีการงอก ไอเอเอจะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ไปยังราก และบางที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับท่อน้ำและมีผลต่อพืชดังนี้

1. กระตุ้นให้เซลล์มีการขยายขนาดและการเจริญของลำต้น
2. กระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวในแคมเบียม และมีผลร่วมกับไซโตไคนิน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. ส่งเสริมให้มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ใช้ลำเลียงน้ำและอาหาร
4. กระตุ้นให้มีการเริ่มงอกรากเมื่อมีการตัดลำต้น และพัฒนาการแสดงแขนงของราก และการเปลี่ยนแปลงของรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แอลโพรลีน เป็นกรดอะมิโนที่พบเฉพาะในพืชที่อยู่ในสภาวะเครียด (Stress) เนื่องจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ภาวะที่ขาดน้ำ หรือดินมีความเป็นกรดสูง เคยมีรายงานว่าแอลโพรลีนสามารถกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอจีนิซีส (Embryogenesis) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ข้าวโพดได้ (Armstrong และ Green, 1985; Vasil และ Vasil, 1986) ต่อมา Chowdhry และคณะ, (1993) ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของแอลโพรลีน และแอลทริปโตเฟนต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอจีนิซีส และการชักนำให้เกิดต้นของข้าวพันธุ์อินดิคา Pusa 169 เมื่อเติมแอลโพรลีน และแอลทริปโตเฟน ลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัส แต่มีผลให้เอมบริโอจีนิกแคลลัสที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงขึ้นด้วย แต่กลไกการทำงานของแอลโพรลีนที่มีบทบาทในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ยังต้องมีการทดสอบต่อไป

Constance และคณะ ได้ศึกษาผลของแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟน ในการเกิด embryogenesis callus และเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นของข้าวโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. cv. Pusa 169 ซึ่งมีโปรตีนสูง (9.8 เปอร์เซ็นต์) และทนต่อโรคและแมลงปานกลาง เมล็ดจะทำการฆ่าเชื้อใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้อาหาร MS ที่มี 2,4-D 10 ไมโครโมล ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ

วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 หลังจากฆ่าเชื้อแล้วเติมแอลโพรลีนที่มีความเข้มข้น 3 6 9 12 และ 15 มิลลิโมล และแอลทริปโตเฟนที่มีความเข้มข้น 20 40 90 240 และ 480 ไมโครโมล ซึ่งผ่านการกรองฆ่าเชื้อ เลี้ยงไว้ในที่แสงน้อย อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส แล้วจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้ลงในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้น คือ MS ที่มี IAA 2.8 ไมโครโมล ไคเนติน 23 ไมโครโมล และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บในอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารชนิดเดิม หลังจากนั้น 30 วัน และได้ผลว่าแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟน ที่ใส่ลงในอาหารที่ชักนำให้กลายเป็นต้น ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามการทดลองก็ได้ผลถึงปริมาณแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟน ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ 12 และ 240 ไมโครโมล ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มจากอาหารที่ไม่มีการเติมแอลโพรลีนและแอลทริปโตเฟน

การพัฒนาไปเป็นยอด และ/หรือ ราก

ไพบูลย์ (2524) กล่าวว่าการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พาเรนไคมา ไปเป็นยอด ราก ใบ หรือดอกนั้น เกิดขึ้นได้จาก 2 ขบวนการ คือ

1. Organogenesis คือ การเกิดเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่น ๆ โดยการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกัน เป็น meristematic cell ซึ่งมีขนาดเล็ก แวคคิวโอลเล็กและไซโตพลาสซึมเข้มข้น มีอัตราการแบ่งตัวสูง อาจเรียกกลุ่มเซลล์เหล่านี้ว่า Meristemoids ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก (Shoot or Root Primodia) การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่น ๆ เกิดอย่างเป็นอิสระ ไม่ขึ้นต่อกัน ขึ้นแต่เพียงว่าเนื้อเยื่อหรือเซลล์ได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญไปเป็นอะไร

2. Embryogenesis คือ การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่น ๆ โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา เหมือนการพัฒนาของไข่หลังผสม กล่าวคือ เซลล์จะแบ่งตัวและเจริญเป็น Proembryo Globular-shaped embryo Heart-shaped embryo Torpedo-shaped embryo จนกระทั่งเป็น embryo ซึ่งจะเจริญไปเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยปลายข้างหนึ่งของ embryo จะเจริญเป็นยอด อีกข้างเจริญเป็นราก

นอกจากนี้ ยังกล่าวถึงขั้นตอนการเกิดต้น และ/หรือ ราก ว่า การเกิด Morphogenosis ไม่ว่าจะผ่านขบวนการ Organogenesis หรือผ่านขบวนการ Embryogenesis จะแบ่งการเจริญและพัฒนาของเซลล์ได้ 2 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ขั้นการเจริญและพัฒนาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เป็นจุดกำเนิดยอดหรือราก โดยผ่านขบวนการ Organogenesis หรือ Embryoids โดยผ่านขบวนการ Embryogenesis ในขั้นตอนนี้เซลล์หรือเนื้อเยื่อต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมีในอาหาร อุณหภูมิ แสง เป็นต้น ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ กล่าวคือ เซลล์จะมีขนาดเล็กลง แวคิวโอลเล็กไซโตพลาสซึมเข้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้น มีการสร้างโปรตีนและ RNA มากขึ้น ขณะเดียวกันก็มีการแบ่งตัวที่เร็วมาก กลุ่มเซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนินของยอด ราก หรือ Embryoids

ระยะที่ 2 ขั้นการเจริญเป็นต้น และ/หรือ ราก เมื่อเกิดเป็นจุดกำเนิดยอดหรือราก หรือเกิดเป็น Embryoids แล้ว เมื่อได้รับอาหารและปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสม ก็จะเจริญเป็นต้น และ/หรือรากที่สมบูรณ์ได้ โดยเขายังพบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญไปเป็นต้นข่าวที่สมบูรณ์ ดังนี้

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

Hendre และคณะ (1975) ได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารต่อการเจริญของแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว และข้าวฟ่าง พบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแคลลัสข้าว คืออาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) แคลลัสที่ได้ มีขนาดไม่ต่างกันมากนัก มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 50-250 มก. มีอัตราการเจริญเติบโตช้าในระยะ 10-15 วันแรก หลังจากนั้นอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ความเข้มข้นของวุ้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยทั่ว ๆ ไปเท่ากับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ pH ของอาหารที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.0-8.0 ถ้าสูงหรือต่ำกว่านี้อัตราการเจริญเติบโตลดลง นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน ก็มีผลต่อการเจริญของแคลลัส คือ แคลลัสจะเจริญได้ดีถ้าใช้ ammonium nitrate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ edamin 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าใช้ ammonium nitrate สูงถึง 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อข้าว และนอกจากการทดสอบผลของกรดอะมิโนแต่ละชนิด (tyrosine cysteine glutamine และ glycine) หรือใช้ร่วมกันพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น ในข้าวเท่ากับ2 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินนั้น เนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีความต้องการในระดับที่ต่างกัน เช่น เนื้อเยื่อข้าวเจริญได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D indolebutyric acid α-NAA หรือ β-NAA ส่วน kinetin ไม่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อข้าว ถ้าใช้ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไปยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อได้ เป็นต้น

Henke และคณะ (1978) ได้ศึกษาการเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากส่วนต่าง ๆ ของข้าวพันธุ์ C.I.8970-S ในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าส่วนต่างๆ ของข้าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2,4-D ความ

สามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งพบว่าอาหารที่ปราศจากฮอร์โมนใด ๆ เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ แคลลัสที่มีอายุน้อยกว่าจะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสที่มีอายุมาก และแคลลัสที่เจริญมาจากส่วนของราก สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าส่วนของใบและลำต้น นอกจากนั้นได้นำต้นใหม่ (ช่วงที่ 1) ที่พัฒนามาจากแคลลัสของชิ้นส่วนพืชทั้ง 3 ชนิด อย่างละ 1 ต้น เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมจำนวน 5 ต้น พบว่ามีบางลักษณะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน คือ จำนวนต้นต่อกอ จำนวนต้นที่ติดเมล็ดต่อกอ และจำนวนเมล็ดลีบต่อรวง

Maeda (1980) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Aichiasahi และ Kinmaze ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ น้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น 15 วัน เกิดแคลลัสขึ้นที่ scutellum หลังจากนั้นอีก 50 วัน แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น นอกจากนี้เนื้อเยื่อจากส่วนของใบ ราก ลำต้น coleoptile ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

ต่อมาในปี ค.ศ. 1981 Inoue และ Maeda รายงานว่า การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของแคลลัสในข้าวต้องใช้ kinetin เป็นตัวกระตุ้นในขั้นสุดท้าย ตรงกันข้ามถ้าใช้ abscisic acid จะเป็นตัวยับยั้งไม่ให้มีการสร้างยอด ถ้าเติม ABA ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วจึงเติม kinetin แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้มาก

ในปี ค.ศ. 1981 Reddy พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของข้าวในอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ และเมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถจะพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ เมื่อต้นใหม่ที่ได้สูงประมาณ 8-10 เซนติเมตร จึงนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมทั่วไป

รัชนี และคณะ (2529) ได้ศึกษาอิทธิพลของน้ำมะพร้าวระยะต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของยอด ราก และแคลลัสในข้าว โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดพันธุ์เหลืองประทิว 123 ในสูตรอาหาร MS ดัดแปลง แลงสูตรดัดแปลงที่เสริมด้วยน้ำมะพร้าวระยะต่าง ๆ กัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะพร้าวกลาง น้ำมะพร้าวแก่ พบว่าสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน มีผลต่อการเจริญของยอดและแคลลัสดีที่สุด น้ำมะพร้าวแก่มีผลต่อการเจริญของยอดและแคลลัสต่ำสุด ไม่พบความแตกต่างของอิทธิพลน้ำมะพร้าวระยะต่าง ๆ ต่อการเจริญของราก

Raina และคณะ (1987) ได้ศึกษาการเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว พันธุ์บาสมาติ 370 พบว่าสามารถเจริญไปเป็นแคลลัส และแคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ อาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสคือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D หรือ 2,4,5-T 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงแคลลัสเหล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมทริปโทเฟน 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

Kishor (1987) ได้ศึกษาความต้องการพลังงานและแรงดันออสโมติค สำหรับการเกิดต้นใหม่ของข้าวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า แคลลัสข้าวเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ในอาหารที่มีค่าแรงดันออสโมติค เท่ากับ 300 osmol แต่จำนวนการเกิดต้นใหม่สูงสุด ในอาหารที่มีแรงดันออสโมติค เท่ากับ 200 osmol ปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำสุดที่ใช้ในการเกิดราก คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเกิดยอดจะเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อที่เจริญบนอาหารที่มีปริมาณซูโครสต่ำ จะทำให้เกิดยอดในเปอร์เซ็นต์สูง และถ้าอาหารที่ใช้เลี้ยงเติมสารที่ทำให้เกิดแรงดันออกโมติค เช่น sorbitol หรือ mannitol จะทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 2 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์

ธิดารัตน์ (2533) ทำการศึกษาเทคนิคการชักนำให้เกิดเป็นต้น โดยทำการทดลองกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 23 ทดลองโดยใช้อาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้น 10 สูตร แต่ละสูตรมีองค์ประกอบเป็น NAA ไคเนติน และ BAP ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ข้าวทั้ง 2 พันธุ์เกิดต้นได้ดีบนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เผดิม (2536) การทดลองเพื่อหาอาหารที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว 6 สายพันธุ์ พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในสภาพที่ได้รับแสง จะดีกว่าในสภาพมืด สูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บาสมาติ 370 และ กข 15 ได้แก่ MS NAA 5: Kin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนข้าวสายพันธุ์นางมล S4 และประดู่แดง ได้แก่ MS NAA 4: Kin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และพันธุ์ปทุมธานี 60 คือ MS NAA 5: Kin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เจริญเป็นต้นอ่อนสำหรับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และนางมล S4 ได้แก่ MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ พันธุ์ปทุมธานี 60 ใช้ MS Kin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่พันธุ์ กข 15 ใช้ MS Kin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนบาสมาติ 370 และประดู่แดง ใช้อาหารแข็งสูตร MS Kin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประภา (2537) ในการศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรีย์ และปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการชักนำให้คัพภะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซส 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสงสามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูง 96.3 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด 9.4 มิลลิเมตร แคลลัสเมื่อถูกทำให้แห้งโดยพักไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วัน จึงย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าย้ายลงโดยไม่ทำให้แห้งก่อน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปเป็นต้น มี 2 สูตร คือ MS IAA 1: BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้ได้แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดสูงสุด 45.8 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.9 ยอด และสูตร MS IAA 1: BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด 45.5 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.7 ยอด

Elumalai Sivamani และคณะ (1996) ศึกษาถึงวิธีการคัดเลือกเพื่อให้ได้แคลลัสที่มีคุณภาพสูง จากเมล็ดข้าวพวกอินดิคา โดยจะใช้การถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาคเข้าไปในแคลลัส แต่แคลลัสที่ใช้จะต้องมีจำนวนมากและมีคุณภาพสูง ซึ่งกลายเป็นปัญหาที่สำคัญต่อกระบวนการทรานส์ฟอร์เมชัน จึงได้มีการศึกษาถึงวิธีการคัดเลือกแคลลัส ที่มีคุณภาพและมีจำนวนมากเกิดขึ้น โดยจะใช้ข้าวพันธุ์ TN 1 ในสกุลอินดิคา เลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร NBKNB บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด หลังจากทำการเปลี่ยนอาหาร 4 ครั้ง ในทุก 2 อาทิตย์ แคลลัสที่ไม่จับกันแน่นจะย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร RN สามารถชักนำให้เกิดต้น โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลาให้แสงและไม่ให้แสงเป็น 16 : 8 ชั่วโมงต่อวันตามลำดับ ความเข้มแสง 100 – 125 มิลลิเมตรต่อตารางเมตรต่อวินาที ประมาณ 10 วันจะเริ่มมีรากเล็ก ๆ ชักนำให้เป็นต้นใหม่บนอาหารแข็งสูตร RN สามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นข้าวที่มีระบบรากที่สมบูรณ์ แล้วนำไปปลูกลงดินในสภาวะแวดล้อมที่ควบคุมเพื่อให้ได้เมล็ด ส่วนแคลลัสที่จะนำไปทรานส์ฟอร์เมชัน จะย้ายลงในอาหารแข็งสูตร NB แล้วนำไปถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาค แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NBH คัดเลือกแคลลัสที่สามารถเจริญได้มาเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร NBKNB จากการทดลองพบว่า ในข้าวอินดิคาแต่ละพันธุ์ ไม่สามารถใช้วิธีเดียวกันได้ ทั้งในการเพาะเลี้ยงและการชักนำให้งอกเป็นต้นใหม่

นอกจากนี้มีรายงานว่า การเติมสารประกอบอินทรีย์บางชนิดลงในสารอาหาร สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดเอมบริโอจีนิกแคลลัส (Embryogenic Callus) ได้ ซึ่งจะมีผลดีต่อการชักนำให้เกิดต้นในที่สุด 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)

Shipins Zhans (1996) ทำการทดลองในข้าวอินดิคาสายพันธุ์ IR24 IR64 IR72 และสายพันธุ์ IR57311-95-2-3 สามารถทำให้งอกใหม่ได้จากแคลลัสอายุ 3-4 สัปดาห์ โดยใช้เวลาประมาณ 6-8 สัปดาห์ ต้นข้าวจะได้รับการถ่ายยีนโดยการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ พลาสมิดนี้มียีนที่ควบคุมไฮโกรมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส (*hph*) ซึ่งมีความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซินบี และมียีนเบต้ากลูคูโรไนเดส (β-glucuronidase *uid* A) ต้นที่งอกใหม่จะมีความต้านทานต่อไฮโกรมัยซินบี และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดง *uid* A(GUS) gene ออกมา การงอกของต้นแม่ (R_0) เป็นไปอย่างปกติ ขณะที่ต้น R_0 และ R_1 พบว่าต้นที่มีความต้านทานไฮโกรมัยซินยังคงมียีน *hph* ซึ่งได้รับมาจากเมนเดเลียนแฟชั่น และโปรโตคอล ของการถ่ายยีนข้าวอินดิคาก็ได้ถูกสร้างขึ้น

Bhattacharjee และคณะ (1998) การศึกษาพืชต้นใหม่ที่เจริญจากโปรโตรพลาสต์ซึ่งใช้กระบวนการ somatic hybridization และ cybridization การนำเอมบริโอของข้าวสายพันธุ์ผสมระหว่าง IR 36 และ IR65 มาเลี้ยงให้เป็นเซลล์แขวนลอย โปรโตพลาสต์ที่ได้มาจากเซลล์แขวนลอยจะสามารถแบ่งตัวเป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กและมีการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นแล้วเจริญเติบโตไปเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ โดยจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ให้กับแคลลัส ในการทดลองครั้งนี้จะใช้พืช 31 พันธุ์ใน IR 36 และ 28 พันธุ์ใน IR 65 จะมีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ ในวันที่ 30 จะแสดงผลบวกในจำนวนของพืชที่มีการเจริญเติบโต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของ plating ที่สูงจะบ่งชี้ให้เห็นว่าพืชมีการเจริญเติบโตสูง การศึกษาเกี่ยวกับความแตกต่างของ protoclonal ในส่วนของพืช IR 36 จะแสดงให้เห็นนัยสำคัญในทางบวกในด้านน้ำหนักของทั้ง 100 เมล็ด ในขณะที่ความสูงของพืชและความยาวของช่อดอกจะให้ผลทางลบเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของเมล็ดซึ่งมีการควบคุมไว้ในทางกลับกัน ในส่วนต่างๆของพืช R_0 R_1 R_2 จะให้ผลเหมือนๆกันในสายพันธุ์ IR 65 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไม่แตกต่างทางนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุพันธ์ของเมล็ดที่ควบคุมไว้ในทุกๆลักษณะที่ทดสอบ การใช้โปรโตพลาสต์เป็นการช่วยประหยัดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์

Chen และคณะ (1998) ทำการศึกษาถึง protocol ที่ใช้ในการถ่ายยีนในการข้าวที่เป็นที่ยอมรับโดยวิธี microparticle bombardment ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในวิธีนี้ผลิตผลที่ถูกใช้จำนวนมากไม่ขึ้นกับการถ่ายยีนที่ใช้ยีน *hph* และอีกหลาย ๆ ยีนที่น่าสนใจ แต่ที่สำคัญที่เป็นจุดมุ่งหมายสูงสุดในการเพาะเลี้ยงแคลลัส หรือเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เมื่อเราให้มีการดูดซึมก่อนและหลังการถ่ายยีนในสภาวะที่มีความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรต 0.6 โมลาร์ โดยที่อายุที่เหมาะสมของแคลลัส ณ ที่เวลาในการถ่ายยีน อายุของแคลลัสที่เหมาะสมในการถ่ายยีนก็คือที่ 4, 9, 14 และ 19 วัน โดยที่เรานำมาวางบนอาหารแข็ง NB และขั้นตอนวิธีการต่าง ๆ จะรวมทั้งหมดเป็นเวลา 8 สัปดาห์จากเวลาของการถ่ายยีน เฉลี่ยที่ 22.3 $\pm$ 9.7 ต่อ 100 แคลลัสและ 22.4 $\pm$ 8.0 ในเซลล์แขวนลอย วิธีนี้เป็นรูปแบบที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายยีนเข้าไปในข้าว และจะสามารถขยายงานในการศึกษาการถ่ายยีนต่อไป

การถ่ายยีนในข้าว

วิชัย (2538) ได้กล่าวถึงการถ่ายยีนให้กับเซลล์พืชไว้ว่า การส่งถ่ายยีนจากภายนอกเข้าสู่เซลล์พืชนั้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งอาจทำให้พืชนั้นแสดงลักษณะของยีนที่ต้องการได้ ต้นพืชที่มียีนจากแหล่งอื่นสอดแทรกเข้าไปอยู่ในยีโนม และแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในรูปแบบอื่น

ลักษณะของยีนนั้นออกมาได้เรียกว่า พืชจำลองพันธุ์ (Transgenic Plant) กระบวนการส่งถ่ายยีนให้กับพืชแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการใหญ่ ๆ คือ

1) การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง (Direct Gene Transfer) เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยไม่มีพาหะเป็นตัวนำ เช่น การใช้สารเคมี polyethylene glycol การใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (microinjection) และการใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) สำหรับการใช้สารเคมี PEG และกระแสไฟฟ้านั้น เซลล์เป้าหมายที่จะรับยีนหรือดีเอ็นเอส่วนใหญ่เป็นโปรโตพลาสต์ ดังมีรายงานที่ประสบความสำเร็จของการใช้สารเคมี PEG ในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าวอินดิคา (Peng และคณะ, 1992; Datta และคณะ, 1992) และข้าวจาปอนิคา (Uchimiya และคณะ, 1986; Zhang และ Wu, 1988) นอกจากนี้ PEG ยังสามารถนำมาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนของเซลล์แขวนลอยขนาดเล็กของข้าว (Lee และคณะ, 1991) ได้ด้วย สำหรับการใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าว พบว่ามีรายงานเฉพาะในข้าวจาปอนิคาเท่านั้น (Toriyama และคณะ, 1988; Zhang และคณะ, 1988; Tada และคณะ, 1990; Toki และคณะ, 1992) ในข้าวอินดิคายังไม่มีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ด้วยวิธีนี้ แต่มีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่คัพภะของข้าวพันธุ์ IR36 โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Xu และ Li, 1994) สำหรับข้าวจาปอนิคามีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนใบของต้นข้าวด้วยกระแสไฟฟ้า (Dekeyser และคณะ, 1990) นอกจากนี้มีความพยายามปรับใช้เทคนิคทั้ง 2 วิธีนี้ร่วมกัน คือ ใช้สารเคมี PEG ร่วมกับการใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าว Taipei 309 (Yang และคณะ, 1988)

2) การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ (Vector Mediated Gene Transfer) เป็นวิธีที่ใช้พาหะ (Vector) ในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช พาหะที่ได้รับการพัฒนาจนประสบผลสำเร็จและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumifaciens* ที่เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งมี Ti plasmid เป็นพาหะส่งถ่ายยีนที่เราต้องการ ไปเชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอในโครโมโซมของพืช วิธีนี้ได้รับความนิยมแพร่หลาย เนื่องจากสามารถถ่ายยีนให้กับหลาย ๆ ส่วนของพืช สามารถทำได้ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดคือ ได้ผลดีเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น เนื่องจากในธรรมชาติเชื้อชนิดนี้ไม่เข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Hooykaas-Van Slogteren, 1984) มีความพยายามถ่ายยีนในข้าวด้วย *A. tumefaciens* โดยการปรับปรุงวิธีต่าง ๆ รวมทั้งสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การฝากถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*

ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ *Agrobacterium*

จากการศึกษาเอกสารการจำแนกจุลินทรีย์ โดย Buchanan และ Gibbons (1974) พบว่า *Agrobacterium* เป็นจุลินทรีย์ดินในสกุล Rhizobiaceae ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เป็นเชื้อที่อยู่ในดินอย่างอิสระหรือในน้ำ เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลล่า ไม่สร้างสปอร์ เมื่อเจริญบนอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ จะสร้างเมือกที่เป็นน้ำตาลเชิงซ้อนขึ้นรอบ ๆ เซลล์ โคโลนีไม่มีสี ผิวเรียบ บางสายพันธุ์โคโลนีมีผิวขรุขระ ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญ แต่สามารถเจริญได้ในที่ซึ่งมีออกซิเจนน้อย เช่นในเนื้อเยื่อของพืชที่เกิดบาดแผล อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-9.0 เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับพืช โดยทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ cortex ของพืชอย่างรวดเร็ว เรียกว่า cortical hypertrophies พืชหลายชนิดเมื่อได้รับเชื้อมักจะเกิดปุ่มปม (crown gall tumor) บนรากและลำต้น (ไพโรจน์, 2526) และจะสามารถแยกแบคทีเรียออกมาได้จากปุ่มปมเหล่านี้แล้วทำการจำแนกโดยเพาะเชื้อเข้าไปในพืชทดลอง (Veldstra, 1972)

Buchanan และ Gibbons (1974) ได้จำแนกสกุล *Agrobacterium* ออกเป็นชนิด โดยอาศัยลักษณะที่สำคัญดังนี้

ก. ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน สร้าง 3-ketolactose

(1) ทำให้เกิดปุ่มปม

A. tumefaciens

(2) ไม่ทำให้เกิดปุ่มปม

A. radiobacter

ข. ไม่ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน สร้าง 3-ketolactose

(1) ทำให้เกิดรากฝอย

A. rhizogenes

(2) ทำให้เกิดปุ่มปมบนราสเบอร์รี่

A. rubi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

พลาสมิดใน *A. tumefaciens*

A. tumefaciens มีพลาสมิดขนาด 140-235 kilobases เรียกว่า Tumor-inducing หรือ Ti plasmid ตามลักษณะซึ่งสามารถทำให้พืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดเกิด crown gall tumor คือพืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม และเนื้อเยื่อพืชเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลบนต้นพืช (Willmitzer และคณะ, 1982) แบคทีเรียไม่สามารถทำให้เกิดปุ่มปมในพืชที่ไม่มีบาดแผล และการเกิดปุ่มปมกับพืชจะขัดขวางการเจริญของพืช หรือทำให้พืชตายเพราะจะไปรบกวนระบบหมุนเวียนของน้ำและอาหารในพืช (Hooykaas และ Schilperoort, 1984) เมื่อนำเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในอาหารสภาพปลอดเชื้อ จะไม่พบแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค แต่เซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (transformed cell) ที่เกิดขึ้นจะมีการพัฒนาเป็นแคลลัส (เนื้อเยื่อพืชที่ยังไม่พัฒนาเป็นต้นหรือราก) หรือ teratoma (เนื้อเยื่อพืชที่พัฒนาเป็นยอดอ่อน ๆ และลำต้นเห็นได้ชัด) โดยการเจริญของพืชไม่จำเป็นต้องเติม auxin และ cytokinin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเนื้อเยื่อปกติ (Willmitzer และคณะ, 1982; Caplan และคณะ, 1983)

ส่วนหนึ่งของ Ti plasmid คือ T-DNA (transferred DNA) จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งต่อมาจะทำให้เกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นปุ่มปม ยีนในส่วน T-DNA มีบทบาททำให้พืชสร้าง opine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน opine มี 2 ชนิดคือ octopine, nopaline (Owens, 1982) นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้าง agropine ซึ่งเพิ่งค้นพบใหม่ (Petit และคณะ, 1983) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนคือ octopine dehydrogenase หรือ nopaline dehydrogenase ซึ่งถูกกำหนดโดยยีนบนส่วน T-DNA (Schrimsher และ Taylor, 1982; Montoya และคณะ, 1977)

ชนิดของ opine ที่สร้างขึ้นในปุ่มปม จะถูกกำหนดโดยสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สามารถนำ opine ที่สร้างขึ้นไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยอาศัย catabolic gene บน Ti plasmid สร้างเอนไซม์สำหรับย่อยสลาย opine (Panagoponlos และ Psallidas, 1973)

T-DNA มียีนควบคุมการสร้างฮอร์โมน ซึ่งมีผลกระตุ้นให้เซลล์พืชแบ่งตัวและเจริญอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดปุ่มปม (Amasino และ Miller, 1982)

กลไกการถ่ายทอดยีนของ *A. tumefaciens*

การศึกษากลไกการทำงานของเชื้อ *Agrobacterium* นี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับ *A. tumefaciens* Ohyama และคณะ (1979) ศึกษาพบว่า หลังจากที่มีการปลูกเชื้อบนชิ้นส่วนพืชแล้ว ระยะเวลาที่แบคทีเรียเชื่อมติดกับเซลล์พืช ใช้เวลาประมาณ 20-60 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์เนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

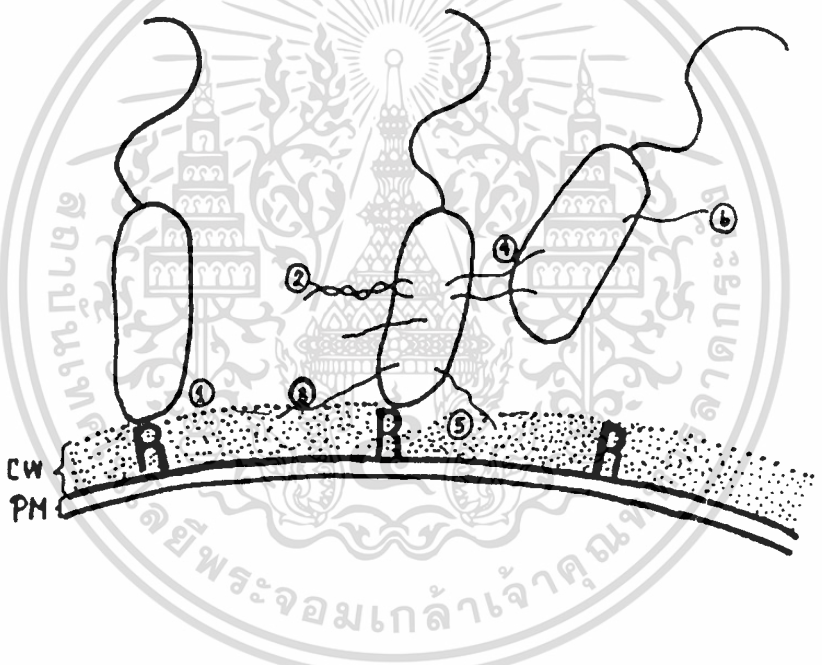
33517

พืชและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเชื่อมติดไม่ต้องการ Ca^{2+} และถ้ามีจะยับยั้งการเชื่อมติดอีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 6

การศึกษาโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการยึดเกาะของ *A. tumefaciens* กับยาสูบแครอท (Smith และ Hindley, 1978; Ohyama และคณะ, 1979; Matthysse และคณะ, 1981)

รูปแบบของการ infect ของเชื้อ *A. tumefaciens*

ระยะที่ 1 แบคทีเรียจะยึดเกาะที่ตำแหน่งเป้าหมาย (Receptor = R) ที่เฉพาะเจาะจงบนผิวของเซลล์พืช ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ภาพแบบจำลองการยึดเกาะของ *Agrobacterium tumefaciens* ตัวเลขในวงกลมหมายถึง ระยะต่าง ๆ ที่กล่าวถึง

ที่มา : Matthysse และคณะ (1981)

ระยะที่ 2 หลังจากมีการยึดเกาะแล้ว แบคทีเรียจะสร้างเส้นใยเซลลูโลส

ระยะที่ 3 เส้นใยเซลลูโลสจะยึดแบคทีเรียที่บริเวณผิวของผนังเซลล์ (CW) เนื่องจากเส้นใยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเป็นเซลลูโลส เซลล์พืชไม่สามารถย่อยสลายเส้นใย และแยกแบคทีเรียออกจากเซลล์พืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 4 เส้นใยที่มีความยาวจะยึดจับกับแบคทีเรียตัวอื่น

ระยะที่ 5 แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับผนังเซลล์พืช จะปลดปล่อยเอนไซม์ซึ่งย่อยสลายผนังเซลล์ของพืช ดังนั้นจะทำให้มีการสัมผัสของแบคทีเรียกับ plasma membrane (PM) ของเซลล์พืช ต่อมาทำให้เกิดการเคลื่อนย้าย Ti plasmid จากแบคทีเรียไปสู่เซลล์พืช

ระยะที่ 6 แบคทีเรียที่ถูกยึดจับโดยเส้นใยจะมีการสร้างเส้นใยขึ้นมาเองด้วย ซึ่งทำให้มีการยึดเกาะทางอ้อมกับเซลล์พืช และเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่จะยึดเกาะกับผนังเซลล์พืช โดยผ่านตำแหน่งเป้าหมาย และเส้นใยเซลลูโลส

การใช้แบคทีเรียมีจำนวนเซลล์มากในการปลูกเชื้อบนเซลล์พืช เพื่อให้แบคทีเรียมีการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสอย่างรวดเร็ว และเกิดแบคทีเรียกลุ่มใหญ่จำนวนมาก พืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่เกิดปุ่มปมจากเชื้อ *A. tumefaciens* เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถยึดเกาะกับผนังเซลล์พืชได้

เมื่อพลาสมิดถูกเคลื่อนย้ายจากแบคทีเรียไปสู่เซลล์พืช จะเข้ารวมกับโครโมโซมของพืช กลไกการชักนำให้เกิดปุ่มปมระดับโมเลกุล มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง (Matthysse และคณะ, 1981; Chilton, 983) เพื่อหาทางนำ Ti plasmid มาใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดยีนที่มีประโยชน์ให้แก่พืชต่อไป (ธนุสรา, 2530)

ยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) มีข้อแตกต่างกันคือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการ ที่ทำให้คัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ที่ได้รับยีนที่ถ่ายฝากลงไปได้ง่าย ๆ เพื่อตรวจสอบผลสำเร็จของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบว่า ส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้น มีการแสดงออกหรือไม่ และแสดงออกได้มากน้อยเพียงใด ในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อส่วนใด ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืชนั้น อาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ ที่ทราบแล้วทำงานได้ตลอดเวลาและในเนื้อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะต่ออยู่กับส่วนของ DNA ที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

ตัวอย่างยีน	เอนไซม์ที่สร้างได้	ลักษณะที่แสดงออก
ยีนเครื่องหมาย		
Hpt	hygromycin phosphotransferase	ต้านทานไฮโกรไมซิน
Dhfr	dihydrofolate reductase	ต้านทาน methotrexate
CAT	Chloramphenical acetyltransferase	ต้านทานคลอแรมเฟนิคอล
NPT II	neomycin phosphotransferase	ต้านทานกานามัยซิน
Aro A	5-enolpyruvyl shilimate-3-phoshate 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 และโปรโมเตอร์จากไวรัสของกระหล่ำ cauliflower mosaic virus (CaMV35S promoter) หรือโปรโมเตอร์ที่มาจากพืชที่ต้องการทดสอบ

ข้อควรคำนึงในการใช้เวคเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนในพืช คือ ยีนที่จะถ่ายเข้าไปต้องควบคุมโดยโปรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ในเซลล์ของพืช เวคเตอร์ที่ใช้นิยมใช้พลาสมิดที่มีส่วนของ DNA ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E. coli* อยู่ด้วย เพื่อใช้เพิ่มปริมาณการใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายฝากยีน เวคเตอร์ที่ใช้ต้องมีส่วนของ RB และ LB ของ T-DNA หรือมีส่วนที่เหมือนกับส่วนที่ใส่ไว้ในพลาสมิด Ti ของ *Agrobacterium* (สุรินทร์, 2536)

Chan และคณะ (1992) ได้ทำการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวพวกอินดิคา สายพันธุ์ Taichung Native 1 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการถ่ายยีน และผลของเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่ง (PSC) ในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยทำการถ่ายยีนไปที่ใบ ลำต้น และรากของต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุประมาณ 3-4 วัน และคัดเลือกแคลลัสที่มีการเปลี่ยนสภาพ โดยเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่ปฏิชีวนะ G418 พบว่ามีเพียงแคลลัสที่เจริญจากรากที่เลี้ยงในอาหารที่มี PSC เท่านั้นที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะG418 ส่วนแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่น ๆ เป็นแคลลัสที่ไม่สามารถเปลี่ยนสภาพ ซึ่งไม่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ G418 ซึ่งแคลลัสพวกนี้จะตายเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ G418 นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อแล้ว อายุของชิ้นส่วนก็มีความสำคัญเช่นกัน พบว่าต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุประมาณ 3-4 วัน เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการถ่ายฝากยีน สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวคเตอร์ มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีน จากการทดลองถ่ายฝากยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ที่เกิด mutation บริเวณยีน vir หรือ *Agrobacterium* ที่มีส่วนของ T-DNA ไปที่รากของต้นอ่อน พบว่าไม่มีแคลลัสที่มีการเปลี่ยนสภาพเกิดขึ้นเลย จึงเป็นการยืนยันว่ายีน vir และส่วนของ T-DNA มีความสำคัญมากต่อการถ่ายยีน จากการศึกษาเกี่ยวกับเวคเตอร์พบว่า การถ่ายยีนโดยใช้ *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 และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *gusA* โดยทำการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ต่าง ๆ ไปที่ยอด ราก และเมล็ด ที่ได้มาจากต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุ 4 วัน ซึ่งเจริญมาจากเมล็ดหรือคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ 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 ในชิ้นส่วนที่ได้จากต้นอ่อนที่มาจากเมล็ด ไม่มีความแตกต่างจากชิ้นส่วนที่ได้จากต้นอ่อน ที่มาจากคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ และการเตรียมต้นอ่อนจากเมล็ดนั้นทำได้สะดวกกว่าการเตรียมต้นอ่อนจากคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ จากการทดลองพบว่า 2,4-D ที่มีในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงต้นอ่อน (ระยะที่เมล็ดกำลังจะงอก) จะมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ GUS แต่การเติม 2,4-D 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับชิ้นส่วนพืชจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของ GUS จากการทดลองถ่ายฝากยีนในข้าว 3 พวก คือ อินดิคา จาปอนิคา และกลาเบอริมา รวมทั้งสิ้น 21 สายพันธุ์ พบว่าข้าวอินดิคาจะมีการแสดงออกของ GUS มากที่สุด ซึ่งมากกว่าข้าวจาปอนิคาและกลาเบอริมา ถึง 2-3 เท่า ข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti ชนิดอะโกรปีน จะมีการแสดงออกของ GUS (เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีฟ้า) สูงถึง 32 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti ชนิดนอพพาลีนและออกโทปีน ซึ่งมีการแสดงออกเพียง 16 เปอร์เซ็นต์ และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชิ้นส่วนพืชที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การถ่ายยีนโดยใช้ pBIN19 เป็นเวคเตอร์ จะมีการแสดงออกของ GUS มากกว่าเมื่อใช้ pEND4K เป็นเวคเตอร์

Hiei และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองถ่ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวพวก จาปอนิคา 3 สายพันธุ์ คือ Tsukinohikari Asanohikari และ Koshihikari โดยศึกษาถึงผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวคเตอร์ ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช คือการเลี้ยงในอาหารที่มีซิโตซิลิงโกน ที่อุณหภูมิประมาณ 22 องศาเซลเซียส ถึง 28 องศาเซลเซียส หากเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซิโตซิลิงโกนหรือการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงดังกล่าว จะทำให้การถ่ายยีนไม่ประสบผลสำเร็จ จากการเปรียบเทียบชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีน (ปลายยอด รากของต้นอ่อน สคิวเทลลาคัพภะที่ยังไม่เจริญเต็มที่ แคลลัสที่เจริญมาจากรากอ่อน แคลลัสที่เจริญมาจากสคิวเทลลา เซลล์แขวนลอยที่ชักนำมาจากสคิวเทลลา) โดยดูจากการแสดงออกของยีน GUS พบว่าแคลลัสที่เจริญมาจากสคิวเทลลามีการแสดงออกของยีน GUS มากกว่าเนื้อเยื่ออื่น ๆ แสดงว่าการถ่ายยีนไปที่แคลลัสนี้ ทำได้ง่ายกว่าการถ่ายยีนไปยังส่วนอื่น ๆ แคลลัสที่เจริญมาจากสคิวเทลลาจึงเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้ในการถ่ายยีนต่อไป ปัจจัยสุดท้ายที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน คือ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และเวคเตอร์ที่ใช้ โดยทั่วไป *Agrobacterium* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สายพันธุ์ธรรมดา (ordinary strain) เช่น LBA4404 และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการบุกรุกพืช (super virulent stain) เช่น EHA101 นอกจากนี้เวคเตอร์ที่ใช้ยังแบ่งเป็น binary เวคเตอร์ เช่น pIG121Hm ซึ่งพัฒนาจาก pBIN19 และ super binary เวคเตอร์ เช่น pTOK162 จากการทดลองพบว่าการถ่ายยีนในข้าว Tsukinohikari และ Koshihikari โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404(pTOK223) จะมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีกว่าการใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404(pIG121Hm) และ EHA101(pIG121Hm) ส่วนสายพันธุ์ EHA101(pTOK223) นั้น จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำมาก

เครื่องหมายที่ใช้คัดเลือก (Selectable marker) และโปรโมเตอร์ (Promoter) สำหรับการถ่ายยีนข้าว

Dekeyser และคณะ (1989) กล่าวถึงการศึกษาด้านการเพาะเลี้ยงและการถ่ายยีนที่ผ่านมา ได้มีการทดลองใช้สารคัดเลือก และยีนที่ต้านทานต่อสารคัดเลือกเหล่านั้นเป็นจำนวนมาก สารคัดเลือกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ก็คือ กานามัยซิน G418 และไฮโกรมัยซิน ซึ่งล้วนแต่เป็นสารในกลุ่ม อมิโนไกลโคซายด์ แอนติไบโอติกที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (translation) ของเซลล์ สารเหล่านี้สามารถทำให้เสียคุณสมบัติได้ด้วยปฏิกิริยา Phospholylation โดยใช้ Tn5 neomycin phospho-transferase II (*npt-II*) gene หรือ Hygromycin B resistance gene ที่ได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Escherichia coli สารคัดเลือกอื่น ๆ เช่น บลีโอมัยซิน เมธโททรีเซน และฟอสฟีโนทริซิน ไม่เป็นที่นิยมใช้ สารบลีโอมัยซิน ทำให้เกิดการแตกหักของเส้นดีเอนเอในเซลล์ยูคารีโอททั่วไป ทำให้บลีโอมัยซิน เป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดร้ายแรง ส่วนเมธโททรีเซน มีฤทธิ์จับกับ catalytic site ของ Dihydrofolate reductase ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถสังเคราะห์ไทมิดีน และทำให้เซลล์ตายในเวลาต่อมา ส่วนฟอสฟีโนทรีซิน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ กลูตามีนซิทีเตส (GS) ในกระบวนการสังเคราะห์กลูตามีนในสิ่งมีชีวิต เป็นสาเหตุทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาชนิดของโปรโมเตอร์ และเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกให้เหมาะสม สำหรับใช้ในการคัดเลือกแคลลัสข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน โดยทำการทดลองกับโปรโมเตอร์ 6 ชนิด ที่เชื่อมต่อกับยีน *npy-II* ในจำนวนนี้มีโปรโมเตอร์ 1' transcript 2' transcript ของออกโทปีน T_R-DNA ด้วย จากการทดลองพบว่า โปรโมเตอร์ 2' transcript ของออกโทปีน T_R-DNA มีประสิทธิภาพมากกว่าโปรโมเตอร์ CAMV35S 3-4 เท่า และมีประสิทธิภาพมากกว่าโปรโมเตอร์ nos และโปรโมเตอร์ 1' transcript ของออกโทปีน T_R-DNA 10 เท่า นอกจากนี้การทดลองยังชี้ให้เห็นว่า การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวมีความว่องไวต่อสารคัดเลือก เมธโททรีเซน ฟอสฟีโนทรีซิน และบลีโอมัยซิน ที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่มีความต้านทานต่อสาร G418 และไฮโกรมัยซินที่มีความเข้มข้นปานกลาง สำหรับกาน่ามัยซินที่ความเข้มข้นสูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวได้เพียงส่วนน้อยเท่านั้น สรุปได้ว่า สารคัดเลือกที่สมควรใช้คือ บลีโอมัยซิน ซึ่งจะสามารถแยกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนกับเซลล์ปกติได้ชัดเจน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือจำนวนชุดของยีน พบว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน และถ้าพบจำนวนชุดของยีนหลายชุด มีความต้านทานต่อสารคัดเลือกได้ดีกว่ากรณีที่พบชุดของยีนเพียงชุดเดียว โดยเฉพาะในกรณีที่ยีนนั้นมีระดับการแสดงออกต่ำ จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern blot พบว่าในกรณีที่มีชุดของยีนเพียงชุดเดียว จะมีความผิดปกติเกิดขึ้นบนชิ้นดีเอ็นเอเสมอ เช่น มีการขาดหายไปของยีน *npt-II* มีรายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของยีนที่พบ หรือเมื่อมีการถ่ายยีนนั้น ๆ ให้กับพืชโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวพันธุ์ไทย

ได้แก่ 1.1 สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML)

1.2 สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (SP 60)

1.3 สายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (SP 90)

1.4 สายพันธุ์ กข 6 (RD 6)

1.5 สายพันธุ์ กข 23 (RD23)

1.6 สายพันธุ์นางมล

1.7 สายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 (KTH)

1.8 สายพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT)

1.9 สายพันธุ์บาสมาติ

2. สารเคมี

2.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร NB

2.2 สารเคมีใช้ฟอกฆ่าเชื้อได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ , สารเปียกใบ (tween-20)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ 2,4-D NAA ไคเนติน BAP

2.4 กรดอะมิโน ได้แก่ แอลโพรลีน เคซีนไฮโดรไลเสส

2.5 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 95 เปอร์เซ็นต์

3. ภาชนะเครื่องแก้ว

3.1 บีกเกอร์

3.2 ขวดรูปชมพู่

3.3 ปิเปตต์

3.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.5 จานแก้ว

3.6 แท่งแก้วคน

4. เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร

4.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด

4.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

4.4 หม้อนึ่งความดัน

5. มีดผ่าตัด
6. ปากคีบ
7. จุกยางชนิดทนความร้อน
8. อะลูมิเนียมฟอยล์
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. เครื่องเขย่า
11. . สเปคโตรโฟโตมิเตอร์
12. ไมโครเวฟ
13. พาราฟิล์ม
14. ตู้ปลอดเชื้อ
15. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
16. กล้องสเตอริโอ
17. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ภาพ
18. ตู้อบ
19. ตู้บ่มเชื้อ

วิธีการทดลอง

1. การถ่ายยีน

1.1 การศึกษาถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในแคลลัสของข้าว 4 สายพันธุ์

1.1.1 เมล็ดข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 และชัยนาท

1.1.2 แกะเปลือกเมล็ดข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 และชัยนาทพันธุ์ละ 500 เมล็ด ลงในฟลาสก์ขนาด 600 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่า เป็นเวลา 2 นาที

1.1.3 เทแอลกอฮอล์ทิ้งแล้วฟอกต่อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารเปียกใบ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบเหมาะสมโดยดูจากการเคลื่อนตัวของเมล็ดข้าวให้สัมผัสกับสารละลายคลอรอกซ์ทั่วถึงกันเป็นเวลา 45 นาที

1.1.4 เทสารละลายคลอรอกซ์ออก ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

1.1.5 ตักเมล็ดข้าวออกจากฟลากส์อย่าให้เมล็ดสัมผัสกับปากฟลาสก์วางเมล็ดบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับน้ำบางส่วนที่ติดมากับเมล็ดทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

1.1.6 คีบเมล็ดวางลงบนอาหารแข็งสูตร NB_1 จานละ 20 เมล็ด

1.1.7 เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันจะพบว่ามีแคลลัสออกมาจากเมล็ดข้าว

1.1.8 ทำการตัดส่วนที่เป็นแคลลัสออกมาวางบนอาหารแข็งสูตร NB_1 + AS (ที่มีความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์)

1.1.9 นำสารละลายของเชื้อ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ AGL-1 pCAMBIA(1301) EHA 105 pCAMBIA(1301) และ LBA 4404 pCAMBIA (1301) ที่ OD 0.01 นำไปหยดลงที่แต่ละแคลลัส แคลลัสละ 10 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

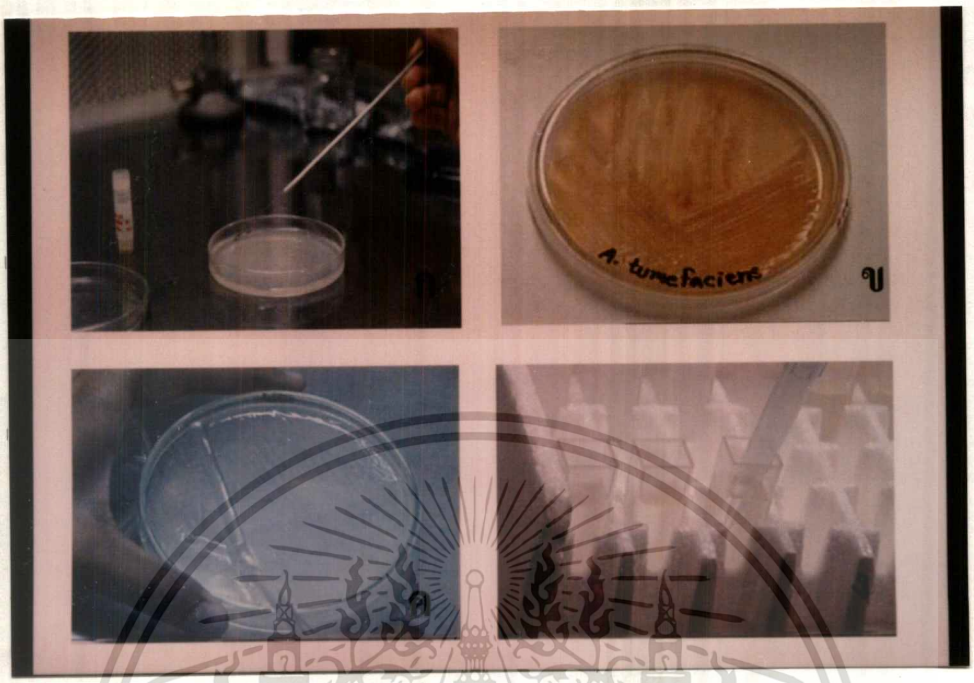
1.1.10 นำแคลลัสไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมด้วยเซโฟแทกซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วแช่ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้าง 2 ครั้ง

1.1.11 นำแคลลัสที่ล้างมาวางบนอาหาร NB_5+ เซโฟแทกซิน เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำแคลลัสมาทำการตรวจสอบโดยการเติม GUS-buffer ให้ท่วมแคลลัสแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 6-8ชั่วโมง(Li และคณะ, 1992)

1.1.12 ดูด GUS-buffer ออกแล้วเติมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ลงไปให้ท่วมแคลลัสแล้วทำการตรวจวัดผล

1.1.13 แคลลัสหลังจากตรวจวัดผลแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *Agrobacterium*

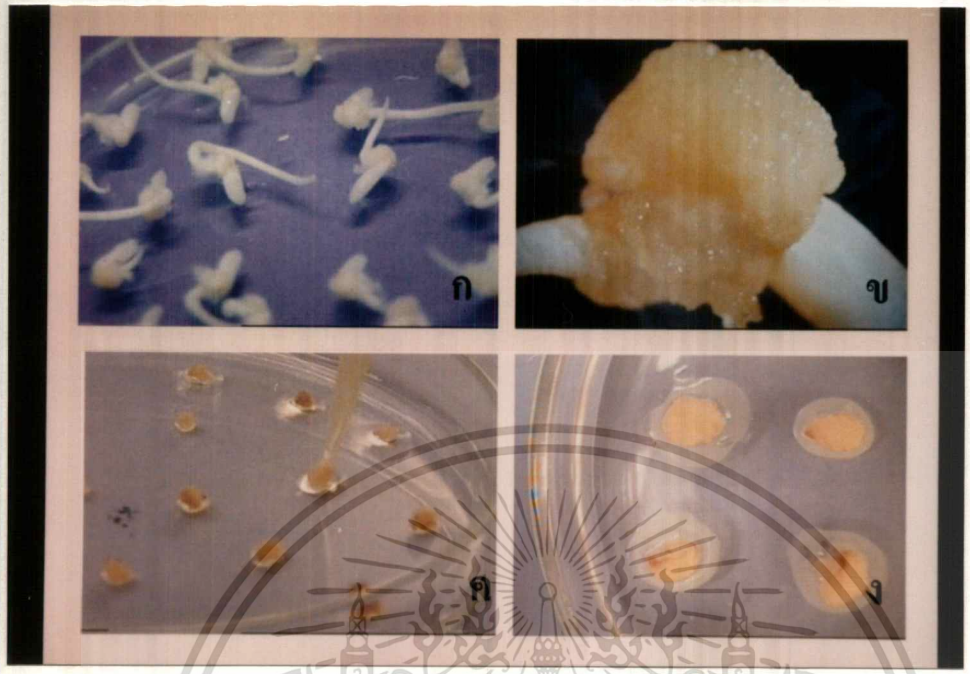
ก. ทำการ streak เชื้อ *Agrobacterium* ลงบนอาหารแข็ง AB บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ข. ลักษณะของเชื้อ *Agobacterium* ที่เจริญบนอาหารแข็ง

ค. ทำการละลายเชื้อออกจากอาหารด้วยอาหารเหลว AAM

ง. นำสารละลายเชื้อไปทำการวัดค่า OD ให้ได้ความเข้มข้น 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



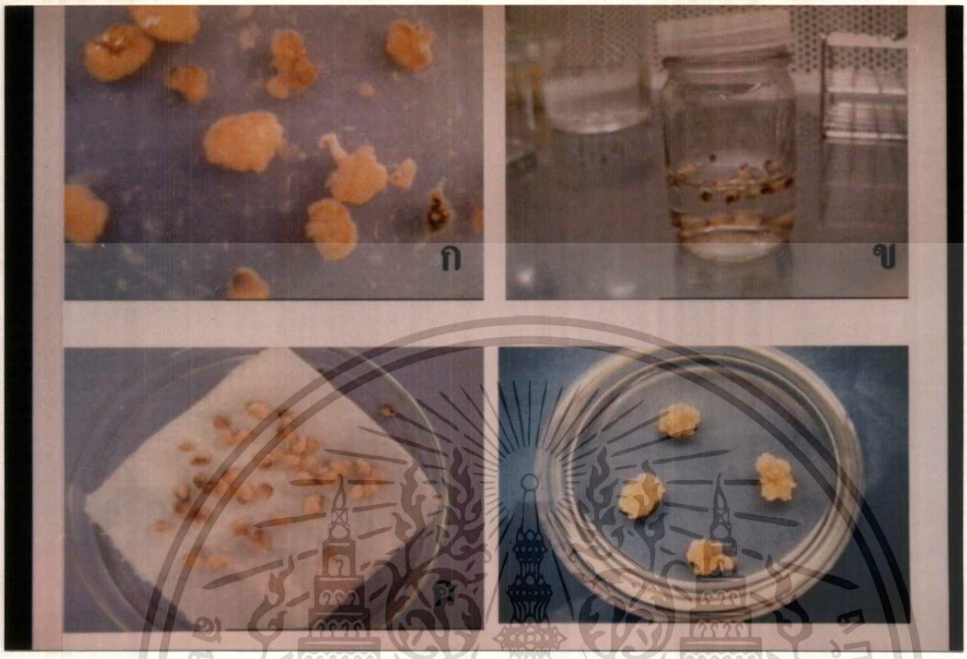
รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการหยดเชื้อ *Agrobacterium*

ก. และ ข. ลักษณะการงอกเป็นแคลลัส

ค. ทำการหยดเชื้อ *Agrobacterium* ลงบนแคลลัสที่วางอยู่บนอาหารแข็ง NB_1+ AS

ง. ลักษณะการขึ้นของเชื้อ *Agrobacterium* บนแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการล้างเชื้อ *Agrobacterium*

ก. ทำการล้างเชื้อ Agrobacterium ในน้ำกลั่นผสมเซโฟแทกซิน

ข. ใส่ในขวดเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง

ค. ตักแคลลัสออกจากขวดวางบนกระดาษทิชชู

ง. นำแคลลัสมาวางบนอาหารแข็ง NB_5+ เซโฟแทกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การศึกษาถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยเชื้อ *A. tumefaciens* ในเซลล์แขวนลอยของข้าว 3 สายพันธุ์

1.2.1 เมล็ดข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ และบาสมาติก

1.2.2 นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (suspension) ที่มีอยู่แล้วโดยเพาะเลี้ยงอยู่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่าง

1.2.3 นำแคลลัสจากในอาหารเหลวมาวางบนอาหารแข็งสูตร NB_1 + AS (ที่มีความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์)

1.2.4 ทำการถ่ายยีนดังข้อ 1.1.9 ถึง 1.1.13

2. ศึกษาผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่

2.1 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสที่มีอายุ 7 วัน ในข้าว 6 สายพันธุ์

2.1.1 เมล็ดข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 กข 6 กข 23 และนางมล

2.1.2 ทำการฆ่าเชื้อดังข้อ 1.1.2 ถึง 1.1.7

2.1.3 นำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NB_1 ถึง NB_{12} ในขวด ขวดละ 5 แคลลัสจำนวน 3 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่าง

2.1.4 ตรวจวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 และ 45 วัน

2.2 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสที่มีอายุ 1 เดือน ในข้าว 3 สายพันธุ์

2.2.1 เมล็ดข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60

2.2.2 ทำการฆ่าเชื้อดังข้อ 1.1.2 ถึง 1.1.7

2.2.3 เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 10 วัน เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของแคลลัสเพื่อเป็นการทำให้แบ่งแยกแคลลัสได้โดยง่าย

2.2.4 นำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NB_1 ถึง NB_{12} ในขวด ขวดละ 5 แคลลัส จำนวน 3 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 ตรวจวัดผล เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 และ 45 วัน

3. ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก ในต้นข้าว 3 สายพันธุ์

3.1 ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดราก ในต้นข้าว 3 สายพันธุ์

3.1.1 เมล็ดข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง สุพรรณบุรี 60 และนางมล

3.1.2 นำต้นข้าวที่มีระบบรากไม่สมบูรณ์ มาทำการตัดรากและใบออกให้หมด แล้วนำตอข้าวที่เหลือไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร $^{1}/_{4}MS_{1}$ ถึง $^{1}/_{4}MS_{12}$ ในขวดขวดละ 3 ต้น จำนวน 5 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่าง

3.1.3 ตรวจวัดผลเมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การถ่ายยีน

1.1 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าว 4 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

1.1.1 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	70	3	4	2	1	0	0	10
	28	80	2	5	3	0	0	0	10
EHA105	25	100	0	0	5	5	0	0	10
	28	100	0	1	5	4	0	0	10
LBA4404	25	30	7	1	2	0	0	0	10
	28	60	4	1	3	2	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

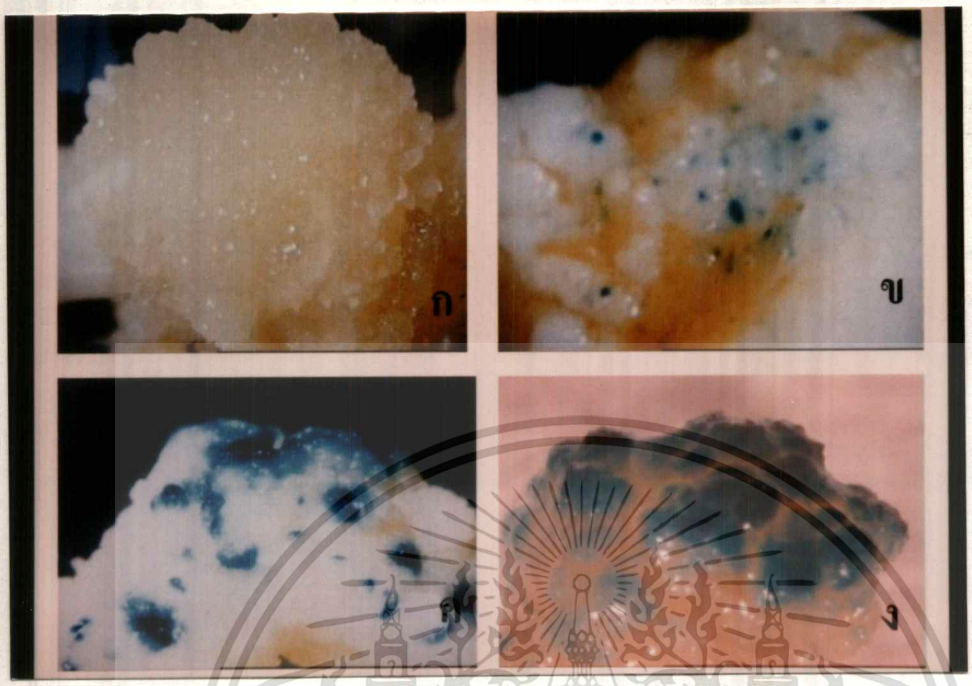
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

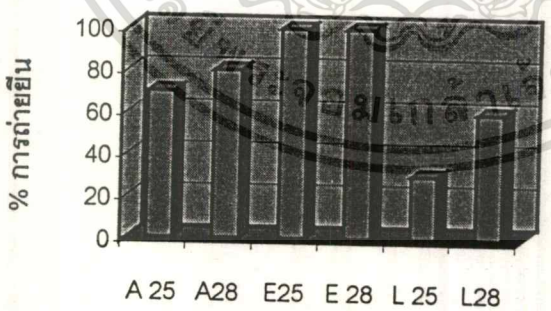
4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงผลของการถ่ายยีนตรวจสอบโดยกล้องสเตอริโอ



รูปที่ 6 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟจะเห็นว่าข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA105 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.1.2 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	0	10	0	0	0	0	0	10
	28	10	9	1	0	0	0	0	10
EHA105	25	40	6	3	1	0	0	0	10
	28	20	8	2	0	0	0	0	10
LBA4404	25	10	9	0	1	0	0	0	10
	28	0	10	0	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

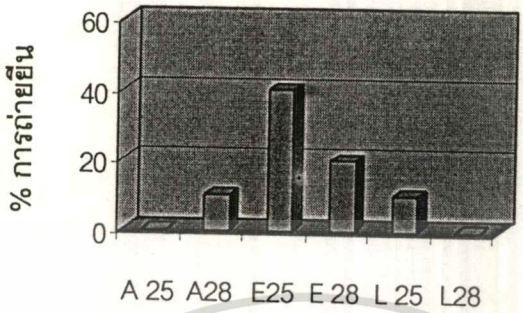
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

จากกราฟจะเห็นว่าข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA105 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

1.1.3 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	10	8	0	0	1	0	0	10
	28	30	7	2	1	0	0	0	10
EHA105	25	30	7	2	1	0	0	0	10
	28	40	6	2	2	0	0	0	10
LBA4404	25	40	6	4	0	0	0	0	10
	28	0	10	0	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

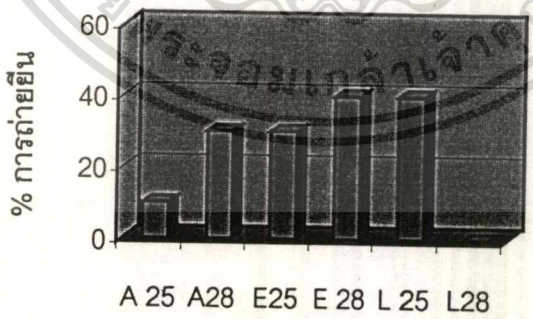
1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4



รูปที่ 8 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในข้าวสายพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟจะเห็นว่าข้าวสายพันธุ์ชัยนาท ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA105 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

1.1.4 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	60	4	4	1	1	0	0	10
	28	10	9	1	0	0	0	0	10
EHA105	25	30	7	2	1	0	0	0	10
	28	40	6	2	2	0	0	0	10
LBA4404	25	10	9	1	0	0	0	0	10
	28	30	7	3	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

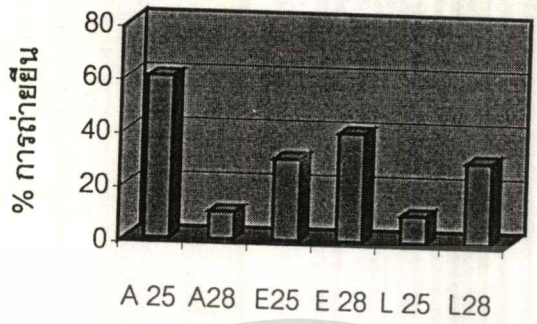
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

จากกราฟจะเห็นว่าข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA105 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.2 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าว 3 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

1.2.1 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน(องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	30	7	1	2	0	0	0	10
EHA105	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	0	0	0	0	0	0	0	10
LBA4404	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	0	0	0	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

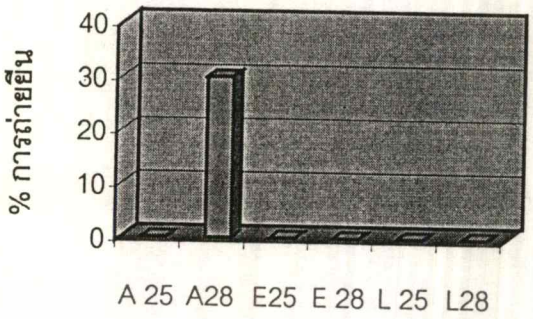
รูปที่ 10 แสดงการถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอย

ก. และ ข. เลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว

ค. แสดงการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium* บนแคลลัส

ง. ผลของการแสดงออกของการถ่ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

จากกราฟจะเห็นว่าเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA105 และ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส ไม่แสดงผลของการถ่ายยีนออกมาให้เห็น

1.2.2 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	0	0	0	0	0	0	0	10
EHA105	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	10	0	1	0	0	0	0	10
LBA4404	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	50	5	3	2	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

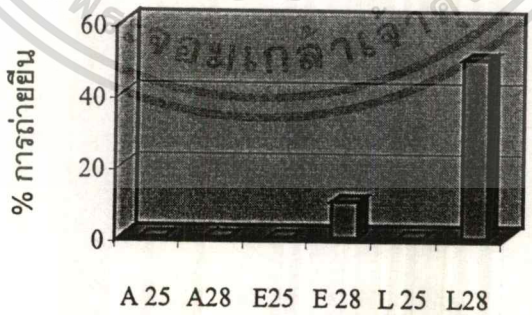
1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4



รูปที่ 12 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนำไปใช้

จากกราฟจะเห็นว่าเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลของการถ่ายยีนที่ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ AGL-1 และ LBA4404 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส ไม่แสดงผลของการถ่ายยีนออกมาให้เห็น

1.2.3 ผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์บาสมาติ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7 แสดงผลของการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA และ LBA ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์บาสมาติ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการถ่ายยีน	อุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีน	ผลการถ่ายยีนดูจากกล้องสเตอริโอ						
			0	1	2	3	4	5	รวม
AGL-1	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	0	0	0	0	0	0	0	10
EHA105	25	10	0	1	0	0	0	0	10
	28	0	0	0	0	0	0	0	10
LBA4404	25	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	0	0	0	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

5 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 4

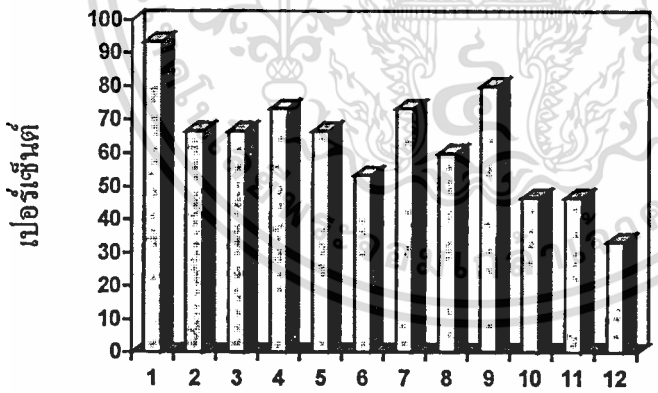
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารแข็งสูตร NB_{11} จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_4 และ NB_{12} ตามลำดับ

2.1.3 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90

ตารางที่ 11 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	14	10	10	11	10	8	11	9	12	7	7	5
เปอร์เซ็นต์	93.33	66.67	66.67	73.33	66.67	53.33	73.33	60	80	46.67	46.67	33.33



รูปที่ 16 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร NB_1 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นต้นใหม่มากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{11} คือ 80 เปอร์เซ็นต์

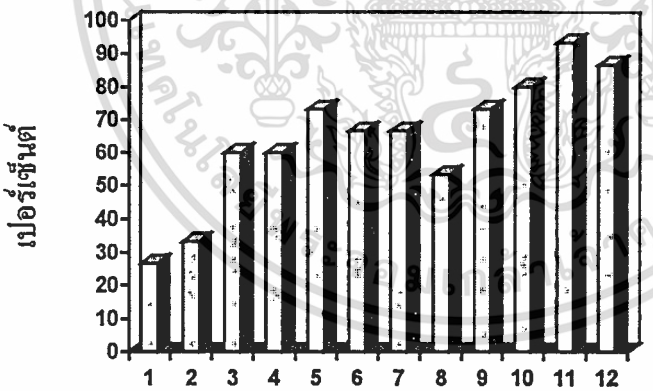
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารแข็งสูตร NB_7 จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_4

2.1.4 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 6

ตารางที่ 12 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 6

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	4	5	9	9	11	10	10	8	11	12	14	13
เปอร์เซ็นต์	26.67	33.33	60	60	73.33	66.67	66.67	53.33	73.33	80	93.33	86.67



รูปที่ 17 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ กข 6

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร NB_{11} ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นต้นใหม่มากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{10} คือ 80 เปอร์เซ็นต์

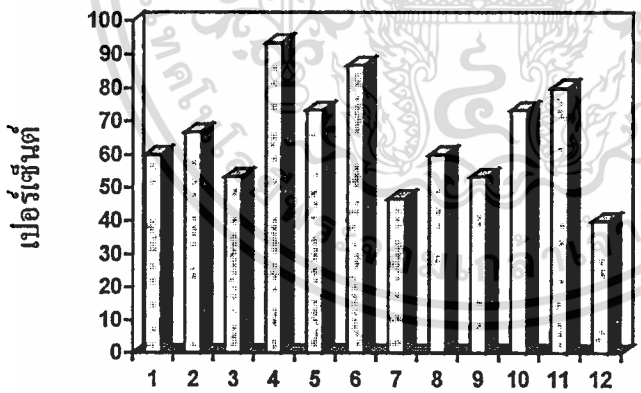
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารแข็งสูตร NB_{12} จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{10} และ NB_{11} ตามลำดับ

2.1.5 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 23

ตารางที่ 13 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ กข 23

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	9	10	8	14	11	13	7	9	8	11	12	6
เปอร์เซ็นต์	60	66.67	53.33	93.33	73.33	86.67	46.67	60	53.33	73.33	80	40



รูปที่ 18 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ กข 23

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร NB_4 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นต้นใหม่มากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_6 คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์

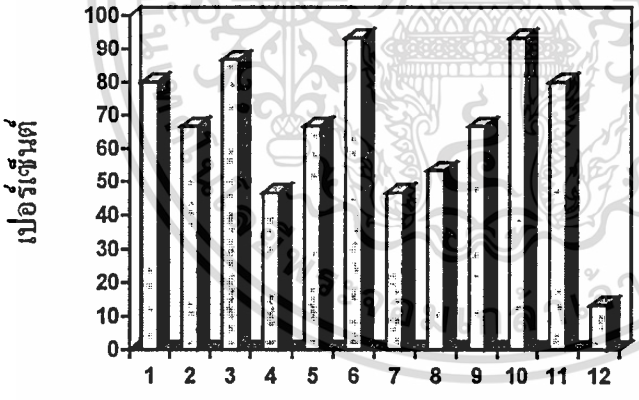
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารแข็งสูตร NB_{11} จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_6 และ NB_5 ตามลำดับ

2.1.6 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์นางมล

ตารางที่ 14 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์นางมล

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	12	10	13	7	10	14	7	8	10	14	12	2
เปอร์เซ็นต์	80	66.67	86.67	46.67	66.67	93.33	46.67	53.33	66.67	93.33	80	13.33



รูปที่ 19 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์นางมล

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร N_6 และ NB_{10} ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะให้การเจริญเป็นต้นมากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_3 คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารแข็งสูตร NB_7 จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_4

รูปที่ 20 แสดงการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสอายุ 7 วัน

ก. ลักษณะของแคลลัสอายุ 7 วัน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ข. ถึง ง. ลักษณะแคลลัสที่เจริญเป็นต้นใหม่

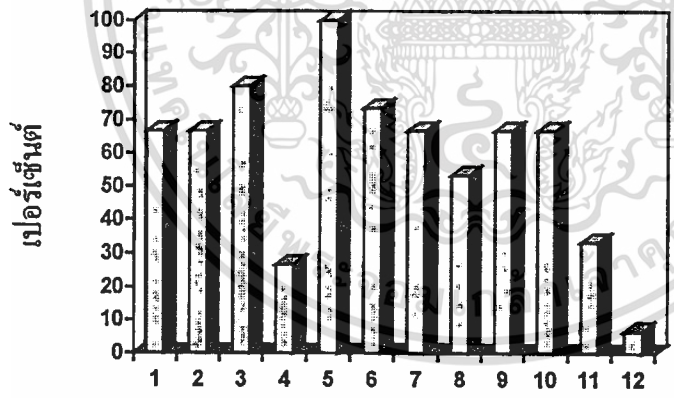
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในแคลลัสที่มีอายุ 1 เดือนในข้าว 3 สายพันธุ์

2.2.1 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

ตารางที่ 15 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	10	10	12	4	15	11	10	8	10	10	5	1
เปอร์เซ็นต์	66.67	66.67	80	26.67	100	73.33	66.67	53.33	66.67	66.67	33.33	6.67



รูปที่ 21 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร NB_5 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นต้นมากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_6 คือ 80 เปอร์เซ็นต์

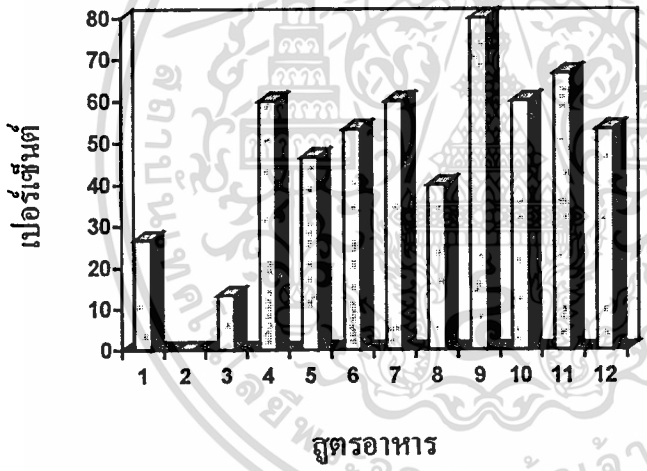
ในอาหารแข็งสูตร NB_1 จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย ซึ่งอาหารแข็งสูตร NB_2 ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

ตารางที่ 16 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	4	0	2	9	7	8	9	6	12	9	10	8
เปอร์เซ็นต์	26.67	0	13.33	60	46.67	53.33	60	40	80	60	66.67	53.33



รูปที่ 22 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร NB_9 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นต้นมากที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{11} คือ 66.67 เปอร์เซ็นต์

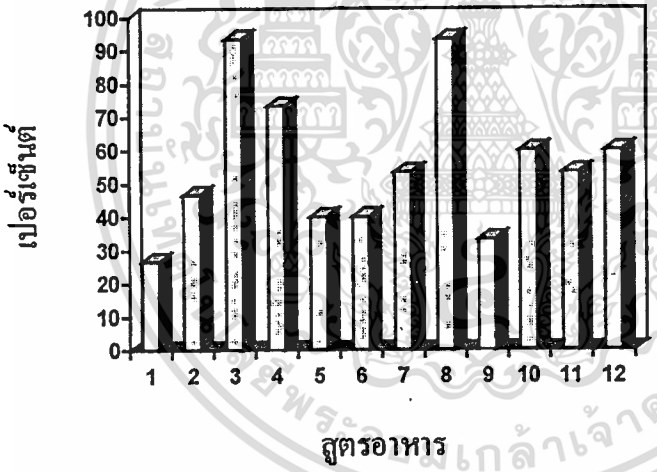
ในอาหารแข็งสูตร NB_{11} จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_2 และ NB_3 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ

ตารางที่ 17 แสดงผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ

สูตรอาหาร	NB_1	NB_2	NB_3	NB_4	NB_5	NB_6	NB_7	NB_8	NB_9	NB_{10}	NB_{11}	NB_{12}
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดต้น	4	7	14	11	6	6	8	14	5	9	8	9
เปอร์เซ็นต์	26.67	46.67	93.33	73.33	40	40	53.33	93.33	33.33	60	53.33	60

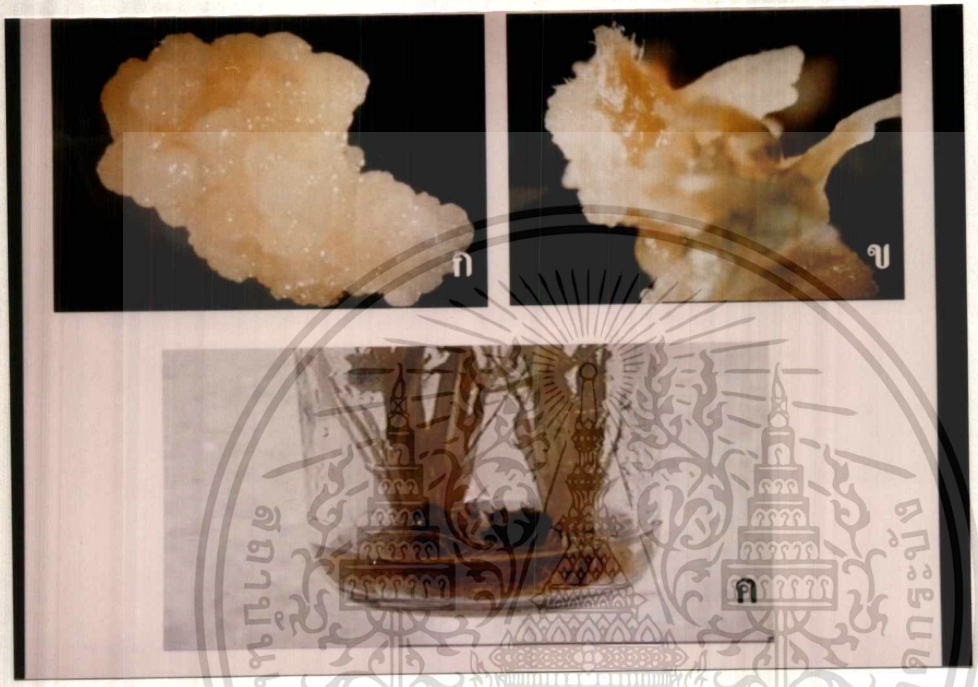


รูปที่ 23 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร NB_3 และ NB_8 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะให้การเจริญเป็นต้นมากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_4 คือ 73.33 เปอร์เซ็นต์

ในอาหารแข็งสูตร NB_7 จะเกิดรากควบคู่กันไปกับการเจริญเติบโตของต้นด้วย รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{10} และ NB_6 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเ... ไม่... ...และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 แสดงการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสอายุ 1 เดือน

ก. ลักษณะของแคลลัสอายุ 1 เดือน

ข. และ ค. ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในต้นข้าว 4 สายพันธุ์ ที่ผ่านการถ่ายยีนมาแล้ว

ตารางที่ 18 แสดงสูตรอาหาร 12 สูตรที่เปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ ฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP เพื่อนำสูตรอาหารนั้นมาศึกษาว่าสูตรอาหารใดที่ทำให้การชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

NAA(mg/l) / BAP(mg/l)	0	0.05	0.25	1.25
0	$^1/_4MS_1$	$^1/_4MS_2$	$^1/_4MS_3$	$^1/_4MS_4$
0.5	$^1/_4MS_5$	$^1/_4MS_6$	$^1/_4MS_7$	$^1/_4MS_8$
1.0	$^1/_4MS_9$	$^1/_4MS_{10}$	$^1/_4MS_{11}$	$^1/_4MS_{12}$

3.1 ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

ตารางที่ 19 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

สูตรอาหาร	$^1/_4MS_1$	$^1/_4MS_2$	$^1/_4MS_3$	$^1/_4MS_4$	$^1/_4MS_5$	$^1/_4MS_6$	$^1/_4MS_7$	$^1/_4MS_8$	$^1/_4MS_9$	$^1/_4MS_{10}$	$^1/_4MS_{11}$	$^1/_4MS_{12}$
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดราก	13	12	12	10	13	11	9	11	9	8	10	14
เปอร์เซ็นต์	86.67	80	80	66.67	86.67	73.33	60	73.33	80	53.33	66.67	93.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในต้นข้าว 4 สายพันธุ์ ที่ผ่านการถ่ายยีนมาแล้ว

ตารางที่ 18 แสดงสูตรอาหาร 12 สูตรที่เปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ ฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP เพื่อนำสูตรอาหารนั้นมาศึกษาว่าสูตรอาหารใดที่ทำให้การชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

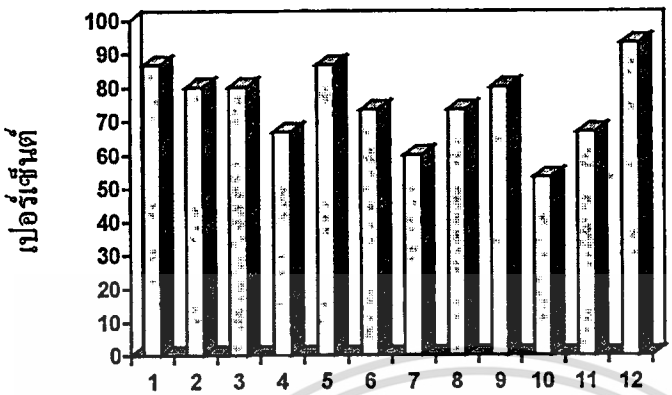
NAA(mg/l) / BAP(mg/l)	0	0.05	0.25	1.25
0	$^1/_4MS_1$	$^1/_4MS_2$	$^1/_4MS_3$	$^1/_4MS_4$
0.5	$^1/_4MS_5$	$^1/_4MS_6$	$^1/_4MS_7$	$^1/_4MS_8$
1.0	$^1/_4MS_9$	$^1/_4MS_{10}$	$^1/_4MS_{11}$	$^1/_4MS_{12}$

3.1 ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

ตารางที่ 19 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

สูตรอาหาร	$^1/_4MS_1$	$^1/_4MS_2$	$^1/_4MS_3$	$^1/_4MS_4$	$^1/_4MS_5$	$^1/_4MS_6$	$^1/_4MS_7$	$^1/_4MS_8$	$^1/_4MS_9$	$^1/_4MS_{10}$	$^1/_4MS_{11}$	$^1/_4MS_{12}$
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดราก	13	12	12	10	13	11	9	11	9	8	10	14
เปอร์เซ็นต์	86.67	80	80	66.67	86.67	73.33	60	73.33	80	53.33	66.67	93.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

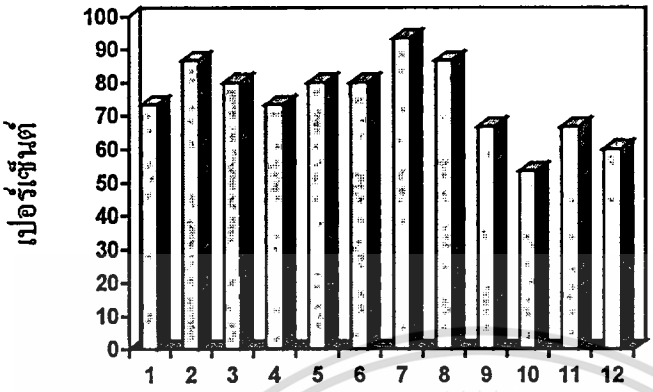
จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_{12}$ ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นรากมากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_1$ และ $^1/_4MS_5$ คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์

3.2 ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

ตารางที่ 20 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60

สูตรอาหาร	$^1/_4MS_1$	$^1/_4MS_2$	$^1/_4MS_3$	$^1/_4MS_4$	$^1/_4MS_5$	$^1/_4MS_6$	$^1/_4MS_7$	$^1/_4MS_8$	$^1/_4MS_9$	$^1/_4MS_{10}$	$^1/_4MS_{11}$	$^1/_4MS_{12}$
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดราก	11	13	12	11	12	12	14	13	10	8	10	9
เปอร์เซ็นต์	73.33	86.67	80	73.33	80	80	93.33	86.67	66.67	53.33	66.67	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง

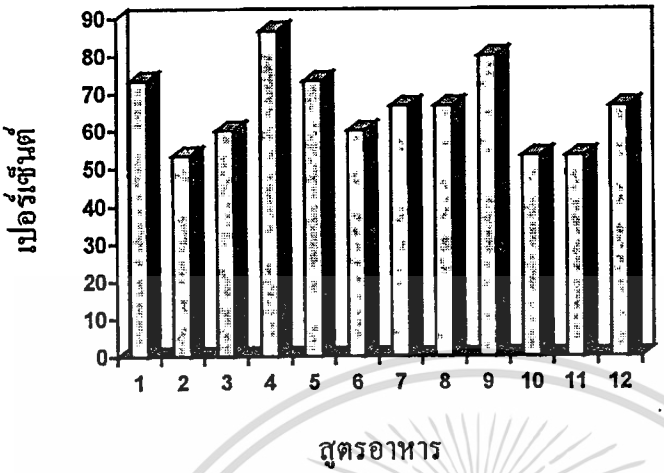
จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_7$ ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นรากมากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_2$ และ $^1/_4MS_8$ คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์

3.3 ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว

ตารางที่ 21 แสดงผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว

สูตรอาหาร	$^1/_4MS_1$	$^1/_4MS_2$	$^1/_4MS_3$	$^1/_4MS_4$	$^1/_4MS_5$	$^1/_4MS_6$	$^1/_4MS_7$	$^1/_4MS_8$	$^1/_4MS_9$	$^1/_4MS_{10}$	$^1/_4MS_{11}$	$^1/_4MS_{12}$
แคลลัสเริ่มต้น	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
การเกิดราก	11	8	9	13	11	9	10	10	12	8	8	10
เปอร์เซ็นต์	73.33	53.33	60	86.67	73.33	60	66.67	66.67	80	53.33	53.33	66.67

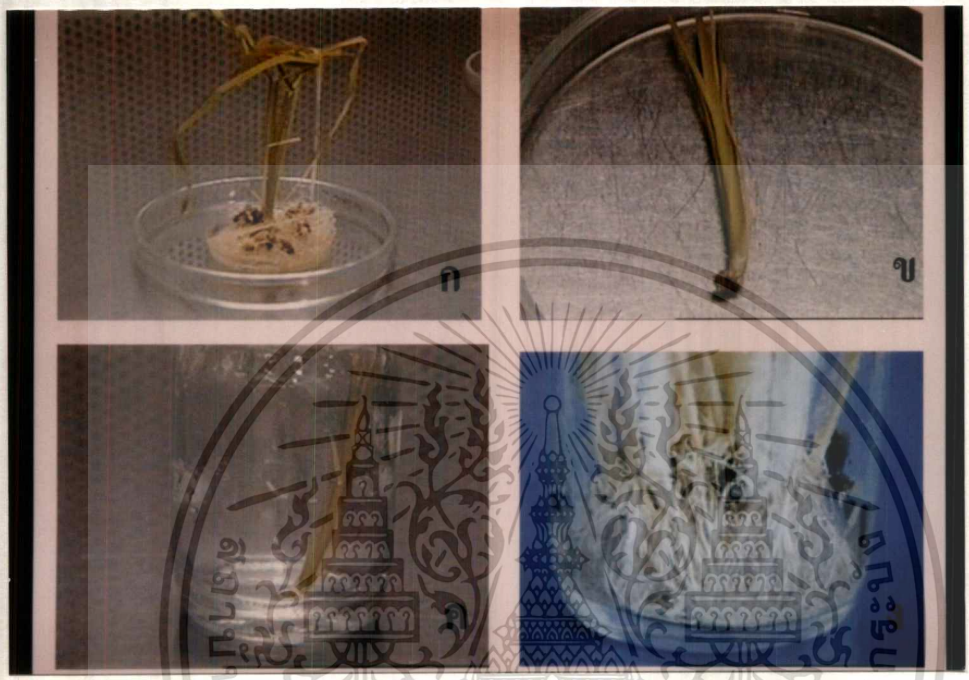
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 27 กราฟแสดงผลการชักนำของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว

จากกราฟจะเห็นว่าอาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_4$ ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้การเจริญเป็นรากมากที่สุด คือ 86.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_9$ คือ 80 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 28 แสดงการชักนำให้เกิดราก

ก. แสดงต้นที่มีระบบรากไม่สมบรูณ์

ข. ทำการตัดรากออก

ค. นำต้นที่ตัดรากแล้วมาวางบนอาหารสูตรต่างๆ

ง. แสดงระบบรากที่สมบรูณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. การถ่ายยีน

การถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ พบว่าผลของการถ่ายยีนจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของข้าว สายพันธุ์ของเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้ในการถ่ายยีน โดยในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิที่ทำการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ EHA 105 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ทำการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ EHA 105 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ในข้าวสายพันธุ์ชัยนาทที่ทำการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ EHA 105 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ที่ทำการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ส่วนสายพันธุ์ EHA 105 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะให้ผลของการถ่ายยีนดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ส่วนผลของการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว ให้ผลของการถ่ายยีนดีที่สุดที่ 28 องศาเซลเซียสของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA 105 กับ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ AGL-1 ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่แสดงผลของการถ่ายยีนออกมาให้เห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ ให้ผลของการถ่ายยีนดีที่สุดที่ 28 องศาเซลเซียสของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 รองลงมาเป็นที่ 28 องศาเซลเซียสของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ EHA 105 กับ LBA 4404 ที่ 25 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ AGL-1 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส ไม่แสดงผลของการถ่ายยีนออกมาให้เห็น

ผลของการถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* ในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์บาสมาติ ให้ผลของการถ่ายยีนดีที่สุดที่ 25 องศาเซลเซียสของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ส่วนการถ่ายยีนด้วยสายพันธุ์ AGL-1 กับ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์ EHA 105 ไม่แสดงผลของการถ่ายยีนออกมาให้เห็น

2. ผลของฮอร์โมน kinetin และฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่

2.1 ผลของฮอร์โมน kinetin และ ฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสที่มีอายุ 7 วันในข้าว 6 สายพันธุ์

การชักนำให้เกิดต้นในข้าวต่างสายพันธุ์กันก็ต้องใช้ปริมาณฮอร์โมนในการชักนำที่แตกต่างกันไปด้วย ฮอร์โมนที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นคือ ฮอร์โมน kinetin และ ฮอร์โมน NAA โดยในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_7 และ NB_4 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้น kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_3 ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_7

ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_6 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{11} ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_{11}

ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_1 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_9 ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในข้าวสายพันธุ์กข 6 ถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_{11} ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{10} ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_{12}

ในข้าวสายพันธุ์กข 23 ถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_4 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_6 ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_{11}

ในข้าวสายพันธุ์นางมล ถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_6 และ NB_{10} ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_3 ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_7

2.2 ผลของฮอร์โมน kinetin และ ฮอร์โมน NAA ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ในแคลลัสที่มีอายุ 1 เดือน

ผลของการชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้งถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_5 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_6 ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_1 และ NB_2

ข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_9 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_{11} ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_{11}

ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิถูกชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร NB_3 และ NB_8 ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับรองลงมาคืออาหารแข็งสูตร NB_4 ถ้าต้องการให้เกิดรากควบคู่กันไปกับการชักนำให้เกิดต้นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_7

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP ในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากในต้นข้าว 4 สายพันธุ์

การชักนำให้เกิดรากในข้าวต่างสายพันธุ์กันก็ต้องใช้ปริมาณฮอร์โมนในการชักนำที่แตกต่างกันไปด้วยเช่นกันกับการชักนำให้เกิดต้น ฮอร์โมนที่ใช้ในการชักนำให้เกิดรากคือฮอร์โมน NAA และฮอร์โมน BAP โดยในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้งถูกชักนำให้เกิดรากมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_{12}$ ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_1$ และ $^1/_4MS_5$

ในข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ถูกชักนำให้เกิดรากมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_7$ ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_2$ และ $^1/_4MS_8$

ในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิวถูกชักนำให้เกิดรากมากที่สุดในอาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_4$ ซึ่งมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารแข็งสูตร $^1/_4MS_9$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธนุสรา วิโนทัย. ศักยภาพของ *Agrobacterium* sp. ในการเป็นพาหะนำสารพันธุกรรม Ri plasmid สู่เซลล์รากพืชบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (2530).

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

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

ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28 (2537) : 27-37.

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

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

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

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

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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.

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

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.

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.

Hiei,Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro,T. 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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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

Potrykus,I,M.W.Saul,J.Paszkowshi and R.D.Sillito. Direct gene transfer to 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.

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.

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 protoplast 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.

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 the 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	3 กรัมต่อลิตร
	pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารแข็งสูตร NB5

	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	3
	NAA	1
	Casien hydrolysate	300
	L-Proline	500
	Sucrose	30 กรัมต่อลิตร
	Phytagel	3 กรัมต่อลิตร
	pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงสูตรอาหารแข็ง NB ที่ใช้ชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่

ชื่ออาหาร	kinetin(มิลลิกรัมต่อลิตร)	NAA(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NB_1	0.5	0.1
NB_2	1.0	0.1
NB_3	1.5	0.1
NB_4	2.0	0.1
NB_5	0.5	0.5
NB_6	1.0	0.5
NB_7	1.5	0.5
NB_8	2.0	0.5
NB_9	0.5	1.0
NB_{10}	1.0	1.0
NB_{11}	1.5	1.0
NB_{12}	2.0	1.0

ฮอร์โมน BAP	3	มิลลิกรัมต่อลิตร
Sucrose	30	กรัมต่อลิตร
Casein	300	มิลลิกรัมต่อลิตร
L-proline	500	มิลลิกรัมต่อลิตร
Phytagel	6	กรัมต่อลิตร
pH	5.8	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงสูตรอาหารแข็ง $^1/_4$MS ที่ใช้ชักนำให้เกิดราก

ชื่ออาหาร	NAA(มิลลิกรัมต่อลิตร)	BAP(มิลลิกรัมต่อลิตร)
$^1/_4MS_1$	0	0
$^1/_4MS_2$	0.05	0
$^1/_4MS_3$	0.25	0
$^1/_4MS_4$	1.25	0
$^1/_4MS_5$	0	0.5
$^1/_4MS_6$	0.05	0.5
$^1/_4MS_7$	0.25	0.5
$^1/_4MS_8$	1.25	0.5
$^1/_4MS_9$	0	1.0
$^1/_4MS_{10}$	0.05	1.0
$^1/_4MS_{11}$	0.25	1.0
$^1/_4MS_{12}$	1.25	1.0
Sucrose	10	กรัมต่อลิตร
Casein	300	มิลลิกรัมต่อลิตร
L-proline	500	มิลลิกรัมต่อลิตร
Phytagel	2.6	กรัมต่อลิตร
pH	5.8	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงสูตรอาหารแข็ง AB ที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* sp.

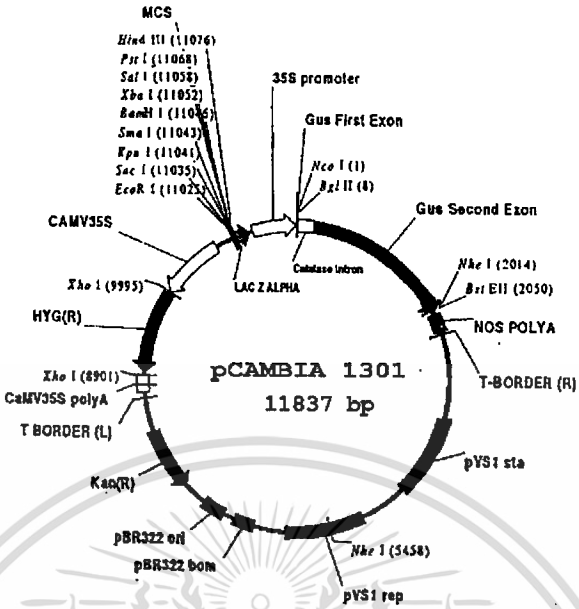
	สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
AB buffer	K_2HPO_4	1500
	NaH_2PO_4	200
AB salt	NH_4Cl	1000
	$MgSO_4.7H_2O$	300
	KCl	150
	$CaCl_2.2H_2O$	150
	$FeSO_4.7H_2O$	2.5
กานามัยซิน		50
วุ้น		15 กรัมต่อลิตร(1.5เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปแสดงลักษณะโครงสร้างพลาสมิดของแบคทีเรีย *Agrobacterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้