

การย้ายยืมในข้าวโพดโดยใช้ อีโคโนเมคที่เรียมและเครื่องยิงยืม



นางสาวกาญจนา ขจรเฉลิมศักดิ์
นายปิยะพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหม.....
เลขทะเบียน 39892
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544

.b.....
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gene transformation in maize (*Zea mays* L.)
by *Agrobacterium* sp. and particle gun bombardment



Miss Kanchana Kajohnchalearmsak
Mr. Piyapong Eurjirapongpun

A special Project submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การย้ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ อโกรแบคทีเรียและเครื่องยิงยีน
Gene transformation in maize (*Zea mays* L.) by *Agrobacterium* sp.
and particle gun bombardment
โดย นางสาวกาญจนา ขจรเฉลิมศักดิ์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 40053004
นายปิยะพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 40053044
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....
(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ

.....
(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

ประธานคณะกรรมการ

.....
(ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์)

กรรมการ

.....
(ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การย้ายขึ้นในข้าวโพดโดยใช้ ไกรแบคทีเรียและเครื่องยิงขึ้น
โดย	นางสาวกาญจนา ขจรฉลิสมศักดิ์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 40053004 นายปิยะพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 40053044
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เยี่ยม
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 พบว่าสูตรที่ทำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด คืออาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ดีที่สุด

การศึกษาความต้านทานของเอ็มบริโออายุ 1 วัน และแคลลัสอายุ 7 วัน ในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ที่ 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโออายุ 1 วัน และแคลลัสอายุ 7 วันไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไป

การศึกษาปัจจัยการย้ายขึ้น พบว่าไกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 ที่ OD 0.01 แคลลัสอายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ประกอบด้วยอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การย้ายขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ AGL-1 ที่ OD 0.01 แคลลัสอายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ประกอบด้วยอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การย้ายขึ้น 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ LBA 4404 ที่ OD 0.01 แคลลัสอายุ 3 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การย้ายขึ้น 80 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาการย้ายขึ้นด้วยเครื่องยิง พบว่าสามารถย้ายขึ้นเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อข้าวโพดได้

Special Project title	Gene transformation in Maize (<i>Zea mays L.</i>) by <i>Agrobacterium sp.</i> and particle gun bombardment
Name	Miss Kanchana Kajohnchalearmsak code 40053004 Mr. Piyapong Eurjirapongpun code 40053044
Dapartment	Applied Biology
Special Project Adisor	Assistant Professor Anurug Poeaim
Academic year	2000

Abstract

Immature embryos culture of INSEE 2 were cultured on solid N₆ medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 0.69 g/l L-proline, 0.1 g/l casein hydrolysate, 2 % sucrose and 2.6 g/l phytagel and NAA 0.5 mg/l, which induce numerous calli.

Callus were transferred to culture on solid MS medium supplemented with 0.69 g/l L-proline, 0.1 g/l casein hydrolysate, 2 % sucrose and 2.6 g/l phytagel, 1 NAA mg/l and 1 mg/l zeatin, which induce plantlets.

Embryos for 1 day and callus for 7 days were culture on N₆ medium complemented with 0, 10, 20, 30, 40 and 50 mg/l of hygromycin B. Embryos for 1 day and callus for 7 days can't developed at 30 mg/l hygromycin B respectively.

Using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 at OD 0.01, 5 days-embryos on solid N₆ medium supplemented with 50 acetosyringone were the best condition transform. Strain AGL-1 at OD 0.01, 5 days-embryos on solid N₆ medium supplemented with 50 acetosyringone were the best condition transform. Strain LBA 4004 at OD 0.01, 3 days-embryos on solid N₆ medium supplemented with 100 mg/l acetosyringone were best condition transform.

Particle gun bombardment founded that transformed efficiency in callus of maize.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการ ดร.อุ้นเรือน เพชรวัลย์ กรรมการ และ ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัยและช่วยตรวจแก้โครงการพิเศษในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตำบลกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่เอื้อเพื่อฝึกข้าวโพดอ่อนพันธุ์อินทรี 2 ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์และฝ่ายธุรการ ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดระยะเวลาปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณ พี่ๆ และน้องๆ ทุกท่านที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1. บทนำ	1
- ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2. ตรวจสอบเอกสาร	3
บทที่ 3. การดำเนินงานวิจัย	30
- วัสดุและอุปกรณ์	30
- วิธีการทดลอง	31
บทที่ 4. ผลการทดลอง	39
บทที่ 5. สรุปผลการทดลอง	53
ภาคผนวก	58
- ภาคผนวกที่ 1.	58
- ภาคผนวกที่ 2.	59
- ภาคผนวกที่ 3.	60
เอกสารอ้างอิง	61

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบและองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพด	9
2. แสดงตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช	26
3. แสดงตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช	26
4. แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นแคลลัส	32
5. แสดงค่าความเข้มข้นของสารประกอบต่าง ๆ ในอาหารสูตร N_6 และ MS ที่ใช้ในการ ชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด	33
6. แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสต่อไฮโกรไมซิน บี	34
7. แสดงความเข้มข้นของอะซิโตไซลิ่งโกนและสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนดขึ้นในการทดสอบ หาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์	36
8. แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน	43
9. แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอ ของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน	44
10. แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอ ของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 3 วัน	45
11. แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอ ของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 3 วัน	46
12. แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอ ของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 5 วัน	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. แสดงผลการย้ายขึ้นด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 48
และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2
อายุ 5 วัน
14. แสดงผลการย้ายขึ้นด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 49
และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2
อายุ 7 วัน
15. แสดงผลการย้ายขึ้นด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 50
และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2
อายุ 7 วัน



ตารางรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงการบุกรุกของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ทำให้เนื้อเยื่อเกิดโรคปุ่มปมในพืช	20
2. แบบจำลองการยึดเกาะของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3. ภาพแสดงลักษณะของการชักนำเอ็มบริโอให้เป็นแคลลัส	39
4. ภาพแสดงลักษณะของการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นที่สมบูรณ์	40
5. แสดงผลการต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี	41
6. ภาพแสดงผลการย้ายยีนด้วยโกรแบกทีเรียม	51
7. ภาพแสดงผลการย้ายยีนด้วยเครื่องยิงยีน	52
8. กราฟแสดงผลการย้ายยีนในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ของสายพันธุ์ AGL-1	54
9. กราฟแสดงผลการย้ายยีนในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ของสายพันธุ์ EHA 105	55
10. กราฟแสดงผลการย้ายยีนในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ของสายพันธุ์ LBA 4404	56

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญรองจากข้าวสาลีและข้าว ข้าวโพดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เหมาะสำหรับที่จะนำไปใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อาหารสัตว์และใช้ใน ขบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆ จากความสำคัญดังกล่าวได้มีการค้นคิดวิธีการปรับปรุงพันธุ์ ข้าวโพดให้มีคุณภาพที่ดี มีผลผลิตสูง ทนต่อสภาพแวดล้อม และต้านทานต่อเชื้อโรคต่างๆ โดย การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและพันธุวิศวกรรมมาช่วย ซึ่งจะช่วยลดปัญหาต่างๆ ในการ ปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างมาก สำหรับส่วนต่างๆ ของข้าวโพดที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ เอนโดสเปิร์ม ช่อ ปลายราก อับเรณู เรณู เอ็มบริโออ่อน เอ็มบริโออ่อนแก่ เซลล์แขวนลอย และโปรโทพลาสต์ ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของข้าวโพดได้เจริญก้าวหน้าไป มาก เช่นมีการย้ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อโดยวิธีที่ใช้กระแสไฟฟ้าเช่น electroporation somatic hybridizer การใช้สารเคมีต่างๆ เช่น polyethylene glycol (PEG) และการใช้ข้อโกรแบคทีเรียในการย้ายยีน จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า วิธีการย้ายยีนโดยข้อโกรแบคทีเรีย และเครื่องยิงยีน (particle gun bombardment) เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดให้มี ประสิทธิภาพที่ดี ซึ่งในโครงการพิเศษนี้ข้อโกรแบคทีเรียและเครื่องยิงยีน ช่วยในการย้ายยีนให้กับ เอ็มบริโอ ชักนำเอ็มบริโอให้เกิดแคลลัส และศึกษาหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการย้ายยีน และการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่หลังจากการย้ายยีน

วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ แคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2
2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สำหรับการย้ายยีนในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2
3. ศึกษาการย้ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีน (particle gun bombardment)
4. ศึกษาการแสดงออกของโปรโมเตอร์ยีนหลังการย้ายยีนเข้าไปในเซลล์ของเนื้อเยื่อข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวโพดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ *Gramineae* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays L.* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

ราก ข้าวโพดมีระบบรากแบบรากฝอย (fibrous root system) ซึ่งเจริญมาจาก 2 ส่วน คือ รากที่เจริญมาจากคัพภะ เรียกว่า primary root หรือ first seedling root เป็นรากที่มีการพัฒนามาจาก แรดิเคิล และมีรากแขนงแตกออกมาเรียกว่า secondary root หรือ lateral root นอกจากนี้ยังมีรากที่เกิดขึ้นที่ scutellar node เรียกว่า seminal root รากทั้งหมดนี้มีการเจริญเติบโตในระยะเวลาสั้นๆ ขณะที่ข้าวโพดเป็นต้นกล้า และจะตายไปเมื่อต้นข้าวโพดโตขึ้น รากส่วนที่สองคือรากที่เจริญมาจาก ลำต้นเรียกว่า adventitious root มีจุดกำเนิดรากที่ข้อส่วนล่างของลำต้น ข้อแรกที่เกิดรากชนิดนี้ คือ coleoptilar node รากเหล่านี้จะเจริญเติบโตอยู่ตลอดชีวิตของข้าวโพด สามารถเจริญแผ่กระจายรอบ ลำต้นมีรัศมีประมาณ 1 เมตร และหยั่งลึกลงไปในดินได้ 2.1-2.4 เมตร

ลำต้น (clum หรือ stalk) ลำต้นมีลักษณะเป็นข้อปล้อง บริเวณข้อปล้องมีเนื้อเยื่อเจริญ ปล้องที่อยู่ส่วนโคนของลำต้นมีขนาดสั้นกว่าปล้องที่อยู่ถัดไป ฐานของปล้องทุกปล้อง ยกเว้นปล้องสุดท้ายมีตาอยู่ 1 ตา ตาที่อยู่ใกล้ดินเจริญเป็นหน่อส่วนตาที่อยู่เหนือดินเจริญเป็นฝักสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ถึง 7.5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 2.5-5.0 เซนติเมตร

ใบ ประกอบด้วยกาบใบและแผ่นใบ กาบใบจะทำหน้าที่หุ้มตาและลำต้น ใบเป็นแผ่นเรียวยาวประมาณ 80 เซนติเมตร มีเยื่อกันน้ำเป็นแผ่นบางอยู่ตรงรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ ส่วนแผ่นใบจะกางออกมีเส้นกลางใบที่เรียกว่า mid rib ใบบอกที่ฐานของใบทั้งสองข้าง

ดอก ข้าวโพดเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้ที่เรียกว่า tassel และช่อดอกตัวเมียที่เรียกว่า ear อยู่บนต้นเดียวกันแต่อยู่คนละตำแหน่ง (monoecious plant) โดยช่อดอกตัวผู้เกิดจากตาของ ลำต้นเป็นแบบ panicle มีแกนกลางดอกที่เรียกว่า rachis ที่ rachis มีกิ่งแขนงขึ้นแรกเกิดอยู่ และบน กิ่งแขนงนี้เป็นที่เกิดของกิ่งแขนงชั้นที่สอง กลุ่มดอกย่อย (spikelet) เกิดเป็นคู่คือชนิดมีก้าน (pedicelled spikelet) และไม่มีก้าน (sessile spikelet) แต่ละกลุ่มดอกประกอบด้วย 2 ดอกย่อย ดอกย่อยที่อยู่ด้านบนมีการเจริญเติบโตดีกว่าดอกย่อยที่อยู่ด้านล่าง แต่ละดอกย่อยประกอบด้วยกลีบ ดอกที่เรียกว่า lemma และ palea มีเกสรตัวผู้ 3 อัน เยื่อรองรับไข่ (lodicule) 2 อัน และเกสรตัวเมีย ที่ไม่ทำหน้าที่ (rudimentary pistil) อีก 1 อัน โดยทั่วไปดอกตัวผู้จะโปรยละอองเกสรอยู่นาน 5-8 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนช่อดอกตัวเมียหรือฝักเกิดจากตาที่มุมใบประมาณข้อที่ 6 นับจากใบธงลงมา มีช่อดอกแบบ spike การพัฒนาของช่อดอกเริ่มขึ้นเมื่อข้าวโพดมีอายุ 40-45 วันหลังงอก ก้านฝักหรือก้านดอก (shank) ถูกหุ้มด้วยกาบใบหรือเปลือกหุ้มฝัก (husk) กลุ่มดอกตัวเมียเกิดเป็นคู่เรียงกันเป็นแถวยาวบนแกนกลางช่อดอกหรือซัง (cob) ดังนั้นฝักข้าวโพดจึงมีจำนวนแถวของเมล็ดเป็นเลขคู่ กลุ่มดอกที่มีก้านสั้นถูกห่อหุ้มด้วยกลีบ (glume) สั้น ๆ 2 กลีบ ภายในแต่ละกลุ่มมีดอกย่อย 2 ดอก เฉพาะดอกย่อยดอกบนเท่านั้นที่เจริญ แต่ละดอกย่อยประกอบด้วย lumma และ palea รวมเรียกว่า chaff มีเกสรตัวเมีย 1 อัน เชีรธงรังไข่ 2 อัน และเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน (rudimentary stamen) 3 อัน ก้านเกสรตัวเมียวาว 10-30 เซนติเมตร เรียกว่าไหม (silk) ไหมแต่ละเส้นจะมีขนที่สามารถรองรับละอองเกสรตัวผู้ได้ตลอดความยาว เส้นไหมบริเวณโคนฝักจะเกิดขึ้นก่อนตามด้วยส่วนโคนฝัก แต่เส้นไหมบริเวณกลางฝักจะยึดตัวโผล่พ้นกาบหุ้มฝักก่อน จึงได้รับการผสมก่อน ทำให้เมล็ดบริเวณกลางฝักมีความสมบูรณ์และขนาดใหญ่กว่าบริเวณโคนและปลายฝัก ไหมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเหี่ยวแห้งเมื่อดอกได้รับการผสมแล้ว ข้าวโพด 1 ฝัก จะมีไหม 400-1000 เส้น ทำให้เกิดเป็นเมล็ด 400-1000 เมล็ด ตามซอกใบมี prophyllum หุ้มอยู่ prophyllum ต่างจากใบธรรมดา คือ มีเส้น 2 เส้น ตาที่เจริญเป็นฝักเมื่อยังอ่อนอยู่เหมือนตาที่เจริญเป็นแขนง แต่ต่อมา prophyllum ของตาฝักจะเจริญต่อไปและเจริญเป็นฝักอ่อน สำหรับก้านฝักจะไม่ยึดตัวทำให้ใบที่เกิดขึ้นมีแต่ก้านใบกลายเป็นเปลือกหุ้มฝัก (กรมวิชาการเกษตร, 2524)

ผลและเมล็ด ผลเป็นแบบ caryopsis ที่มีเยื่อหุ้มผล (pericarp) ติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ ใสไม่มีสี เยื่อหุ้มผลและเยื่อหุ้มเมล็ดรวมเรียกว่า hull ข้าวโพดจะสะสมแป้งไว้ในส่วนของเอ็นโดสเปิร์ม การสะสมแป้งจะสิ้นสุดเมื่อข้าวโพดเจริญเติบโตถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา โดยจะปรากฏเยื่อสีดำ หรือน้ำตาลดำ (black layer) ที่บริเวณโคนของเมล็ด

การจำแนกชนิดของข้าวโพด

จำแนกตามคุณสมบัติของแป้งในเมล็ด

ภายในเมล็ดข้าวโพดประกอบด้วยแป้ง 2 ชนิด คือ แป้งแข็ง (hard starch) และแป้งอ่อน (soft starch) จึงสามารถจำแนกโดยอาศัยตำแหน่งของแป้งแต่ละชนิดและลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด ได้เป็น 7 ชนิด คือ

1. ข้าวโพดป่า (pod corn) เป็นข้าวโพดเก่าที่ปลูกในบริเวณถิ่นกำเนิดแถบอเมริกากลางและใต้เมล็ดข้าวโพดป่าทุกเมล็ดจะมีเปลือกหุ้มเมล็ดอย่างมิดชิดเหมือนกับเมล็ดหญ้า และยังมีเปลือกหุ้ม

ฝักหุ้มอีกชั้นหนึ่ง เมล็ดมีสีต่างๆ หรือเป็นลาย ลักษณะที่กล่าวมานี้ถูกควบคุมด้วยยีน TU อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4

2. ข้าวโพดคั่ว (pop corn) เป็นข้าวโพดที่มีเมล็ดมีแป้งแข็งที่อัดกันอย่างแน่นมาก มีแป้งอ่อนเป็นองค์ประกอบเล็กน้อย ลักษณะรูปร่างของเมล็ดแบ่งเป็น 2 พวก คือ พวกที่รูปร่างเรียวยาวแหลมคล้ายเมล็ดข้าวเรียกว่า rice pop corn และพวกที่มีลักษณะเมล็ดกลมเรียกว่า pearl pop corn เมื่อเมล็ดข้าวโพดชนิดนี้ ได้รับความร้อนระดับหนึ่งแป้งจะขยายตัวสร้างความดันขึ้นภายในจนกระทั่งเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนาแตกออก ปริมาตรของแข็งจะเพิ่มขึ้น 25-30 เท่า ข้าวโพดคั่วจัดอยู่ใน subspecies *evarta*

3. ข้าวโพดหั่วแข็ง (flint corn) เป็นข้าวโพดที่ด้านบนของเมล็ดมีแป้งแข็งเป็นองค์ประกอบ ส่วนแป้งอ่อนจะอยู่ภายในตรงกลางเมล็ดหรืออาจไม่มีเลย เมื่อเมล็ดแห้งจะไม่มีรอยบุบด้านบน ลักษณะดังกล่าวนี้ถูกควบคุมด้วยยีน FI บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ข้าวโพดหั่วแข็งจัดอยู่ใน subspecies *indurata* เมล็ดมีสีต่างๆ เช่น เหลือง เหลืองส้ม ขาว และดำ

4. ข้าวโพดหั่วบุบ (dent corn) เป็นข้าวโพดที่มีส่วนของแป้งอ่อนอยู่ด้านบนของเมล็ด ส่วนแป้งแข็งจะอยู่ด้านล่างและด้านข้าง เมื่อข้าวโพดแก่เมล็ดจะสูญเสียความชื้นทำให้แป้งอ่อนด้านบนหดตัว เมล็ดจึงเกิดรอยบุบ ข้าวโพดชนิดนี้จัดอยู่ใน subspecies *indentata*

5. ข้าวโพดแป้ง (flour corn) เป็นข้าวโพดที่มีองค์ประกอบเป็นแป้งอ่อนเกือบทั้งหมด มีแป้งแข็งเป็นชั้นบาง ๆ อยู่ด้านในเมล็ด เมื่อข้าวโพดแก่เกิดการหดตัวของแป้งในเมล็ดจะเท่า ๆ กัน ทำให้เมล็ดคล้ายกับข้าวโพดหั่วแข็ง แต่มีลักษณะทึบแสง (opaque) ลักษณะนี้ถูกควบคุมด้วยยีนค้อย ๓ ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ข้าวโพดแป้งจัดอยู่ใน subspecies *amylacea*

6. ข้าวโพดหวาน (sweet corn) เป็นข้าวโพดที่น้ำตาลในเมล็ดเปลี่ยนเป็นแป้งไม่สมบูรณ์ เมล็ดจึงมีความหวานมากกว่าข้าวโพดชนิดอื่น ๆ เมล็ดเมื่อแก่จะเหี่ยวยุบ ลักษณะของข้าวโพดหวานถูกควบคุมด้วยยีนค้อยหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม sugar (s) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ,กลุ่ม shrunken2 (sh2) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 และยีน brittle (bt) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5 ข้าวโพดหวานจัดอยู่ใน subspecies *saccharata*

7. ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) เมล็ดข้าวโพดประกอบด้วยแป้งอ่อนที่มีความเหนียวเนื่องจากองค์ประกอบของแป้งส่วนใหญ่เป็นอะมิโลเพกติน (amylopectin) เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนของอะมิโลเพกตินกับอะมิโลส (amylose) มีประมาณร้อยละ 73 : 27 ลักษณะนี้ถูกควบคุมด้วยยีน wx บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ข้าวโพดนี้จัดอยู่ใน subspecies *ceratina*

จำแนกตามองค์ประกอบทางเคมีในเมล็ด

1. ข้าวโพดแป้ง (field corn หรือ starchy corn) เป็นข้าวโพดที่มีการใช้ประโยชน์จากแป้งในเมล็ด ได้แก่ ข้าวโพดหัวแข็ง ข้าวโพดหัวบุบ และข้าวโพดแป้ง
2. ข้าวโพดน้ำมันสูง (high oil corn) เป็นข้าวโพดที่มีปริมาณน้ำมันในส่วนของคัพภะสูง ซึ่งพันธุ์ปกติจะมีร้อยละ 1.2-5.0 น้ำมันข้าวโพดเป็นผลิตภัณฑ์ได้ จากอุตสาหกรรมผลิตแป้งข้าวโพด คุณสมบัติของน้ำมันข้าวโพดคล้ายกับน้ำมันรำข้าวและน้ำมันถั่วเหลือง แต่จะมีปริมาณโคเรสเตอรอลต่ำ
3. ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง (high lysine corn) โปรตีนในเมล็ดข้าวโพดปกติมีร้อยละ 7-10 แต่ข้าวโพดชนิดนี้มีขึ้น 1 คู่ ที่เป็นยีนด้อยของ Opaque-2 (o_2) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 ควบคุมการสังเคราะห์ไลซีนให้ได้ปริมาณสูงกว่าปกติ ลักษณะแป้งจะเป็นแป้งอ่อนและทึบแสง เชื้อราและเมล็ดจะเข้าทำลายเมล็ดได้ง่าย น้ำหนักเมล็ดเบา

จำแนกตามเขตภูมิอากาศ

1. ข้าวโพดเขตอบอุ่น (temperature maize) ข้าวโพดชนิดนี้เจริญได้ดีในเขตเส้นรุ้งที่สูงกว่า 30 องศาเหนือและใต้ อุณหภูมิอากาศในฤดูปลูกค่อนข้างต่ำ และได้รับแสงช่วงยาว ข้าวโพดในกลุ่มนี้ได้แก่ ข้าวโพดที่ปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกา ยุโรป และจีน เมื่อนำข้าวโพดกลุ่มนี้มาปลูกในเขตร้อนจะออกดอกเร็วและผลผลิตต่ำ
2. ข้าวโพดในเขตร้อนชื้น (subtropical maize) เป็นข้าวโพดที่ปลูกในระหว่างเส้นรุ้ง 20-30 องศาเหนือและใต้ อุณหภูมิของอากาศไม่สูงมาก
3. ข้าวโพดในเขตร้อน (tropical maize) เป็นข้าวโพดที่ตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 20 องศาเหนือและใต้ บริเวณที่ปลูกข้าวโพดชนิดนี้ได้แก่ แอฟริกา อเมริกาใต้ และเอเชีย ข้าวโพดในกลุ่มนี้ยังแบ่งปลูกเป็น 2 พวก คือ ข้าวโพดเขตร้อนที่ปลูกในที่สูงจากระดับน้ำทะเล (high land maize) และข้าวโพดที่ปลูกในพื้นที่ราบ (tropical lowland maize)

จำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยว

ข้าวโพดเขตอากาศร้อน (tropical lowland maize) โดยเฉพาะที่ปลูกในพื้นที่ราบจะแบ่งตามอายุการเก็บเกี่ยวได้ 4 พวก คือ

1. พันธุ์อายุสั้นมาก (extremely early variety) เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 80-90 วัน
2. พันธุ์อายุสั้น (early variety) เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 90-100 วัน
3. พันธุ์อายุปานกลาง (intermediate variety) เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 100-110 วัน
4. พันธุ์อายุยาว (late variety) เก็บเกี่ยวเมื่ออายุมากกว่า 110 วัน

จำแนกตามวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์ สามารถจำแนกได้ 4 ประเภท

1. ใช้เมล็ดสุกแก่ เป็นข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวเมล็ดแก่มาใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภคทั้งมนุษย์และสัตว์ หรือใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแป้งหรือน้ำมัน
2. ใช้บริโภคฝักสด คือ ข้าวโพดที่ปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวฝักที่ยังอ่อนไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้แก่ ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดข้าวเหนียว
3. ใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ คือปลูกข้าวโพดแล้วตัดต้นในระยะก่อนแก่เพื่อนำข้าวโพดทั้งต้นไปทำหญ้าสด หญ้าหมัก หรือหญ้าแห้ง
4. ปลูกเพื่อใช้ฝักสำหรับประดับ ข้าวโพดที่เมล็ดบนฝักเดียวกันมีหลากสีเนื่องจากการผสมสารสีที่แตกต่างกัน สามารถนำฝักไปประดับตกแต่งได้

จำแนกตามระยะการเจริญเติบโต

1. ระยะการเจริญเติบโตทางต้นและใบ (vegetative stage) เริ่มตั้งแต่ coleoptile โผล่พ้นผิวดินจนถึงระยะออกดอกตัวผู้ รวมเวลา 45-55 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิ
2. ระยะออกดอก (flowering stage) คือระยะตั้งแต่ดอกตัวผู้บาน จนถึงระยะไหมโผล่พ้นกาบหุ้มฝัก รวมทั้งระยะผสมเกสรด้วย รวมเวลา 5-15 วัน
3. ระยะสะสมน้ำหนักเมล็ด (grain filling) คือระยะที่มีการสะสมแป้งในเมล็ด เริ่มตั้งแต่ระยะน้ำนม (early milk or late milk stage) และระยะแป้งอ่อน (dough stage) จนถึงระยะที่เมล็ดสิ้นสุดการพัฒนา รวมเวลาทั้งสิ้นประมาณ 35-45 วัน
4. ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) เป็นระยะที่มีชั้นเนื้อเยื่อสีดำ (black layer) ปรากฏที่ส่วนโคนของเมล็ด การสะสมน้ำหนักรวมถึงสิ้นสุดลงและมีน้ำหนักแห้งสูงสุด
5. ระยะสุกแก่และเก็บเกี่ยว (harvesting maturity) คือระยะที่ต้น ใบ และกาบหุ้มฝักแห้ง ความชื้นในเมล็ดเริ่มลดลงตามอุณหภูมิและความชื้นของอากาศ

พันธุ์ ข้าวโพดพันธุ์ที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. ให้ผลผลิตสูง อาจจำเพาะสภาพพื้นที่ปลูก (specific location) หรืออาจมีเสถียรภาพสำหรับทุกพื้นที่ปลูก (stabilized location)
2. มีลักษณะทางสัณฐาน (morphology) ที่ดี เช่น ทรงต้นเตี้ย ตำแหน่งฝักต่ำ หักล้มน้อย ใบตั้งรับแสง ระบบรากแข็งแรง และขนาดช่อดอกตัวผู้เล็ก
3. มีลักษณะทางการเกษตรดี เช่น ฝักใหญ่ ช่งเล็ก น้ำหนักเมล็ดมาก กาบหุ้มปลายฝักมิด และลำต้นยังคงความสด (stay green) ในระยะแก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ทนต่อสภาพความแห้งแล้ง ระยะออกใหม่และออกดอกตัวผู้ใกล้เคียงกัน และมีการฟื้นตัวได้เร็วเมื่อได้รับน้ำเพิ่มขึ้นหลังจากสภาพความแห้งแล้ง
5. ทนต่อการใช้อัตราปลูกสูง ตอบสนองต่อการใช้น้ำ และทนต่อสภาพความอุดมสมบูรณ์ต่ำ
6. ด้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูที่สำคัญ
7. มีอายุการเก็บเกี่ยวเหมาะสมต่อระบบการปลูกพืช

การใช้ประโยชน์

ข้าวโพดเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์เป็นอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ รวมทั้งเพื่อการอุตสาหกรรม ทั้งนี้เนื่องจากเกือบทุกส่วนของข้าวโพดมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ การนำมาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่ได้จากเมล็ด ซึ่งประกอบด้วยเอนโดสเปิร์ม คัพภะ และ hull ในสัดส่วนร้อยละ 82.6 11.1 และ 6.2 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1. เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบภายในเมล็ด พบว่าส่วนใหญ่เป็นแป้ง แต่ก็มีโปรตีนและน้ำมันเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ในเอนโดสเปิร์มจะประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ แต่ใน คัพภะมีโปรตีนและไขมันสูง จากองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดทำให้มีการนำข้าวโพดไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางอาจแบ่งได้ดังนี้

1. ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ นำเมล็ดข้าวโพดมาคั่วให้แตกหรือละเอียดสามารถนำมาหุงหรือต้มเป็นอาหารหรือใช้ทำขนมปัง หรือทานผักสด ใช้เป็นอาหารหลักของมนุษย์ในหลายประเทศ เช่น เม็กซิโก สเปน อิตาลี โปรตุเกส แอฟริกาใต้ อินเดีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์
2. ใช้เป็นอาหารสัตว์ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเมล็ดเป็นแป้ง และมีโปรตีนอยู่บ้าง ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ที่มีคุณภาพดีและราคาถูก ผลผลิตเมล็ดข้าวโพดประมาณร้อยละ 72 นำไปใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์ มีบางประเทศโดยเฉพาะประเทศในยุโรปจะปลูกข้าวโพดแล้วตัดข้าวโพดทั้งต้นไปทำหญ้าหมัก (silage) สำหรับเลี้ยงสัตว์
3. ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เมล็ดข้าวโพดสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางด้านอาหาร เช่น แป้ง น้ำมัน น้ำเชื่อม น้ำตาล น้ำส้ม อาหารกระป๋องและอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น พลาสติก ฟิล์ม เครื่องเคลือบ แอลกอฮอล์ กระดาษ และเสื้อผ้า นอกจากนี้มีการผลิตน้ำเชื่อมจากข้าวโพดเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มอย่างกว้างขวางอีกด้วย

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบและองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพด (เปอร์เซ็นต์)

ส่วนของเมล็ด	ทั้งเมล็ด	แป้ง	โปรตีน	น้ำมัน	น้ำตาล	เถ้าน
ทั้งหมด	100	73.5	9	4.3	1.9	1.5
เอนโดสเปิร์ม	82.6	87.6	7	0.83	0.62	0.33
คัพพะ	11.1	8.0	18.3	33.5	10.5	10.6
Hull	6.2	7.0	4.3	1.4	-	0.9

ที่มา : สุพจน์ (2527)

ที่มาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มมาจากทฤษฎีของ Schleiden และ Schwann นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันที่กล่าวว่า สิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วยเซลล์และเซลล์แต่ละเซลล์มีความสามารถที่จะกลับกลายมาเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ได้เนื่องจากมีข้อมูลทางพันธุกรรมเช่นเดียวกันเซลล์เริ่มแรก Gottlieb Haberlandt ชาวเยอรมันสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้สำเร็จครั้งแรกเมื่อเมื่อปี ค.ศ. 1902 หลังจากนั้นก็มีการพัฒนาเรื่อยมาจนกระทั่งสามารถชักนำให้เกิดต้นจากส่วนต่างๆ ของพืชได้สำเร็จ (ประสาพร, 2528)

การคัดเลือกและแยกเนื้อเยื่อพืช (Selection and Isolation of Plant Tissue)

ความสามารถในการชักนำการเจริญเติบโตและเกิดเป็นต้นใหม่ของเนื้อเยื่อพืช ทั้งในรูปที่เป็นเซลล์โพโทพลาสต์ (เซลล์ไร้ผนัง) หรืออวัยวะที่แยกออกมาจากต้นพืช เช่น ปลายราก ใบเลี้ยง ปลายยอด ส่วนต่างๆ ของดอก คัพพะ หรืออับเกสรผู้/ละอองเกสรผู้ ในสภาพที่ปลอดเชื้อ นับเป็นงานวิจัยที่ก้าวหน้าไปมาก โดยอาศัยหลักการและพื้นฐานความรู้จากห้องปฏิบัติการทางด้านพฤกษศาสตร์ จุลชีววิทยา โรคพืช และพันธุศาสตร์ ต่อมาได้พัฒนาเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์พืช (plant propagation; micro-propagation) อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันมีการสร้างห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายในประเทศแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น

ความก้าวหน้าต่อไปในอนาคตยังมีมากขึ้นในแง่ การหาวิธีเหมาะสมทางด้านอุตสาหกรรม การลดต้นทุนการผลิต การผลิตเป็นการค้า และการแพทย์ ขณะเดียวกันนักปรับปรุงพันธุ์ และนักพันธุวิศวกรรมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเลี้ยงเซลล์ กลุ่มเซลล์หรือแคลลัส โพรโทพลาสต์ คัพภะ และส่วนอื่นๆ ของพืช ประกอบกับความรู้ด้านชีวโมเลกุล พันธุศาสตร์ พันธุวิศวกรรม และวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ก้าวหน้าไปอย่างมาก ซึ่งเมื่อใดที่วิทยาการด้านนี้ ก้าวหน้า จนสามารถพัฒนาไปในเชิงการค้า และอุตสาหกรรมได้แล้ว ย่อมส่งผลไปสู่การสร้างพืช พันธุ์ใหม่ๆ ตลอดจนผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในทางปฏิบัติที่กว้างขวางยิ่งขึ้น การคัดเลือก และการแยกให้เนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมและถูกวิธี เป็นส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพและความ สำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งในที่นี้จะได้กล่าวถึงรายละเอียดและข้อควรพิจารณาที่สำคัญ เป้าหมายของการคัดเลือก และการแยกเนื้อเยื่อพืช

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารสำหรับเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารมักมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันตามชื่อผู้ คิดค้น เช่น สูตรอาหารของ White เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ สูตร อาหารของ Vacin และ Went เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ สูตรอาหารของ Murashige และ Shooog (MS) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ และสูตร Chu (N₆) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงข้าวสาลี และข้าวโพดอย่างไรก็ตามสูตรอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ มากมายในปัจจุบันเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

1. สารอนินทรีย์ (inorganic salts) ได้แก่ แร่ธาตุอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ พืช แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก (macronutrients หรือ major elements) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณมากและขาดไม่ได้ พืชต้องการในปริมาณ 25-60 มิลลิโมล หรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการ ในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้เช่นกัน ได้แก่ เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอลต์ (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล พืชต้องการในปริมาณ น้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารอินทรีย์ (organic substances หรือ organic salts) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

2.1 คาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน เป็นสารให้พลังงาน น้ำตาลที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่

2.1.1 กลูโคส (glucose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.15

2.1.2 ฟรุกโทส (fructose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.15

2.1.3 ซอบิทอล (sobitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17

2.1.4 แมนนิทอล (mannitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17

2.1.5 ซูโครส (sucrose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.31

2.1.6 มอลโทส (maltose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ น้ำหนักโมเลกุล 360.3

ปกติจะใช้น้ำตาล 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ ต่ออาหารที่เตรียม 1 ลิตร

2.2 วิตามินเป็นอาหารที่สำคัญ เช่น

2.2.1 ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) วิตามิน B_1 สูตรทางเคมี $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ เป็นตัวที่สำคัญ ปกติต้องการ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.2 อินโนสิทอล (inositol) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.15 ปกติจะใช้ในรูปของ ไมโอ-อินโนสิทอล (myo-inositol) ให้อยู่ในช่วง 50-5000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.3 ไนอะซิน (niacin) หรือ กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) วิตามิน B_3 สูตรทางเคมี $C_6H_5NO_2$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร

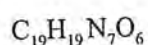
2.2.4 ไพริดอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine-HCl) วิตามิน B_6 สูตรทางเคมี $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.5 ไบโอติน (biotin) วิตามิน H สูตรทางเคมี $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6 กรดแพนโททีนิก (pantothenic acid) สูตรทางเคมี $C_{16}H_{17}NO_5$ ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.7 กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) วิตามิน C สูตรทางเคมี $C_6H_8O_6$

2.2.8 กรดฟอลิก (folic acid) วิตามิน M หรือ วิตามิน B_9 สูตรทางเคมี

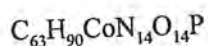


2.2.9 แคลเซียม แพนโทธีเนต (calcium pantothenate) หรือ กรดแพน

โทธีนิก (pantothenic acid) วิตามิน B_5 สูตรทางเคมี $C_9H_{17}NO_5$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.10 ไชยานโนโคบาลามิน (cyanocobalamine) วิตามิน B₁₂ สูตรทางเคมี



2.2.11 โคลีน คลอไรด์ (choline chloride) สูตรทางเคมี $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$

2.2.12 ไรโบฟลาวิน (riboflavin) วิตามิน B₂ สูตรทางเคมี $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$

2.2.13 กรดซิตริก (citric acid) สูตรทางเคมี $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$

2.3 กรดอะมิโน (amino acid) และ Nitrogenous base

กรดอะมิโน ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ไกลซีน (glycine) ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อะลานีน (alanine) อาร์จินีน (arginine) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปารากีน (asparagine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาดิก แอติก (aspartic acid) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีสทีน (cystein) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (glutamine) กลูตามิก แอติก (glutamic acid) ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมล ลิวซีน (leucine) เมทไทโอนีน (methionine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (proline) ใช้ประมาณ 100-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซอรีน (serine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และ ไทโรซีน (tyrosine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจช่วยในการเพิ่มจำนวนของส่วนต่างๆ สำหรับพวก amides อาจมีประสิทธิภาพดีกว่ากรดอะมิโนอื่นๆ กรดอะมิโนในรูปของ L จะมีประโยชน์กว่าในรูปของ D กรดอะมิโนในรูปของ D ไม่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่อาจช่วยลดประสิทธิภาพของรูปแบบ L นอกจากนี้กรดอะมิโนอาจมีผลร่วมในทางตรงข้าม ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อพืช ดังนั้น ประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนในอาหารเพาะเลี้ยงควรพิจารณาเป็นกลุ่ม

2.4. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ได้เองและมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นได้ ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้เร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

2.4.1. ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และรวมกันเป็นกลุ่มของแคลลัส ได้แก่

2.4.1.1. พวกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เช่น

- อินโดอะเซติก แอติก (indol 3-acetic acid = IAA)

สูตรทางเคมี $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ น้ำหนักโมเลกุล 175.18

2.4.1.2. พวกที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น

- แอลฟา-แนพทาลีน อะเซติก แอซิด (α -naphthalene acetic acid = NAA)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{10}O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 186.20

- 2,4 ไดคลอโรโรฟีนอกซี อะเซติก แอซิด (2,4 -dichlorophenoxy acetic acid = 2,4-D)

สูตรทางเคมี $C_8H_6O_3Cl_2$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04

- 2,4,5-ไตรคลอโรโรฟีนอกซี อะเซติก แอซิด (2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid = 2,4,5-T)

- 3-อินโดลบีวไทริก แอซิด (3-indolbutyric acid = IBA)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{13}NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 203.23

- พาราคลอโรฟีนอกซีอะเซติก แอซิด (p-chlorophenoxy acetic acid = pCPA)

สูตรทางเคมี $C_8H_7O_3Cl$ น้ำหนักโมเลกุล 186.59

- 2-แนพทอกซี อะเซติก แอซิด (2-naphthoxyacetic = NOA)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{10}O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 202.20

- 3,6 ไดคลอโรอะนิสิก (3,6-dichloroanisic acid = dicamba)

น้ำหนักโมเลกุล 221.04

- ฟีนิล อะเซติก แอซิด (phenylacetic acid = PAA)

- 4-อะมิโน 3,5,6-ไตรคลอโรพิกโคลินิก แอซิด (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid)

2.4.2. ไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของ adenine ซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต แต่จะมีกิจกรรมได้เฉพาะในพืชเท่านั้น สารพวกนี้ที่ใช้กันมาก เช่น

- 6-เฟอร์ฟูริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine = kinetin)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_9N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 215.21

- 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine = BAP)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{11}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 225.20

- 2-ไอโซเพนทีนิล อะมิโนเพียวรีน (2-isopentenyl aminopurine = 2ip)

(N-isopentenyl aminopurine = Nip)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_{13}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 203.3

- ซีเอติน (zeatin) (เกิดในธรรมชาติ)

สูตรทางเคมี $C_{12}H_{11}N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 219.20

2.4.3. จิบเบอเรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้จะนำมาใช้น้อย หรือใช้ในบางกรณีเท่าที่

ใช้กันทั่วไปได้แก่

- จิบเบอเรลลิน แอซิด (gibberellins acid = GA3)

สูตรทางเคมี $C_{20}H_{32}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5. Nitrogenous base adenine เป็นตัวที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับ cytidylic และ guanylic acid จะช่วยในการเติบโตของเซลล์

2.6. สารอื่น ๆ เช่น สารอินทรีย์อื่น ๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน มะเขือเทศ มันฝรั่ง ถั่ว เป็นต้น บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อยังไม่ทราบแน่ชัด ผงถั่วที่เติมเข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจากเซลล์

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลล์โลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลล์โลส
2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก
3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดรากเป็นขั้นตอน ที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับออกซินในต้นพืชกับสภาพแวดล้อม ถ้าออกซินภายในต้นมีระดับต่ำก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อการเกิดรากที่สมบูรณ์

ผลของไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ส่งเสริมการเจริญของใบ
2. ชะลอการเจริญของราก
3. กระตุ้นให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดหลายยอด
4. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์เนื่องจากมีผลต่อ RNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์และไซโตพลาสซึม

ผลของจิบเบอเรลลินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จิบเบอเรลลินสามารถกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ หรือการแบ่งตัวของเซลล์ หรือทั้งการยืดตัวและการแบ่งตัวของเซลล์

การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือราก

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พาเรโนไคมาเป็น ยอด ราก ใบหรือดอกนั้น เกิดจาก 2 กระบวนการ คือ

1. Organogenesis คือการเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นโดยการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรโนไคมาใกล้เคียงเป็น meristematic cell ขนาดเล็ก แนวคิวโอลเล็กและมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้น มีอัตราแบ่งตัวสูง อาจเรียกได้ว่า Meristemoids ที่สามารถเจริญเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก ได้อย่างอิสระตามแต่จะได้รับการกระตุ้น

2. Embryogenesis คือ การเจริญเป็นอวัยวะโดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนไข่หลังผสม คือจะมีการแบ่งตัวและเจริญเป็น Proembryo Globular-shaped embryo Heart-shaped embryo Torpedo-shaped embryo และ Embryo ตามลำดับ ซึ่งปลายหนึ่งของ embryo จะเจริญเป็นยอดและอีกปลายหนึ่งจะเจริญเป็นราก

ไม่ว่าจะผ่าน Organogenesis หรือ Embryogenesis ก็ตาม การเกิด Morphogenesis จะมีการพัฒนาของเซลล์ใน 2 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เจริญและพัฒนาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นจุดกำเนิดยอดหรือรากโดยต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมีในอาหาร อุณหภูมิ และแสงทำให้เซลล์มีขนาดเล็ก มีแนวคิวโอลเล็ก และไซโตพลาสซึมเข้มข้น สร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพิ่ม รวมถึงมีการแบ่งตัวเร็วมาก กลุ่มเซลล์นี้จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดยอด ราก หรือ Embryoids

ระยะที่ 2 เมื่อเกิดจุดกำเนิดยอดหรือราก หรือ Embryoids แล้วหลังจากได้รับอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมจะเจริญเป็นต้นและ/หรือ รากที่สมบูรณ์ได้โดย พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์มีดังนี้

1. ลักษณะทางพันธุกรรม
2. สภาพของเนื้อเยื่อ
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีอยู่ในอาหาร
4. ชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต
5. องค์ประกอบของอาหาร
6. การทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่มีความเครียดของน้ำเกิดขึ้น

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Green and Philip (1975) ใช้เอ็มบริโอของข้าวโพดสายพันธุ์ A-188 สามารถชักนำให้เป็นแคลลัส และชักนำต่อให้เป็นต้นข้าวโพดได้สำเร็จเป็นครั้งแรก Armstrong and Green (1985) กับ Duncan and Widholm (1987) รายงานว่าแอล-โพรลีน (L-proline) มีผลต่อการเลี้ยงและการเจริญเติบโตเป็นต้นข้าวโพด Duncan และคณะ (1985) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตรที่ได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Potrykus และคณะ (1977) แยกโปรโทพลาสต์ออกจากส่วนของลำต้นบริเวณข้อ และปล้องของข้าวโพดพันธุ์แท้ 2717 โดยใช้เอนไซม์ Cellulase Onzuka R10 นำโปรโทพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร P2 คัดแปลงแบบ microdrop array สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

กอบเกียรติ (2532) ได้ทดลองเลี้ยงเอ็มบริโอข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 บนอาหารสูตร MS (1962) พบว่าเมื่อใช้ 2,4-D 9.048 ไมโครโมล น้ำตาลซูโครส 2-4 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในสภาพมืดตลอดเวลาสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี จากรายงานของ Green และ Philip (1975) พบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดอายุ 16-20 วัน หลังถ่ายละอองเรณู สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 9.048 ไมโครโมล ไกลซีน 7.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เอสพาราจีน 1.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาซีน 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไพริดอกซิน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมแพนโทเทนิค 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานของ Vasil และคณะ (1983; 1984) ได้ทดลองเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2.262-4.524 ไมโครโมล น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำส่วนของ mesocotyl เกิดแคลลัสได้ และเมื่อย้ายลงบนอาหารที่ปราศจาก 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Goble และคณะ (1986) พบว่าเอ็มบริโอของข้าวโพดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D 2.262 ไมโครโมล น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

อนุรักษ์ และนิตยศรี (2535) รายงานว่าการศึกษาระยะการเจริญของข้าวโพดพันธุ์ SW₅ x INV ในอาหารเหลวสูตร N₆ ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า lag phase อยู่ในช่วง 0-15 วัน และ stationary phase และ death phase อยู่หลังจากวันที่ 15 และ นิตยศรี และคณะ (2536) รายงานว่าสามารถชักนำการเกิดเป็นต้นใหม่จากส่วนของแคลลัสในข้าวโพด 7 สายพันธุ์ และต่อมา อนุรักษ์ และนิตยศรี (2541) ศึกษาการเจริญของข้าวโพดพันธุ์ SW₅ ในอาหารเหลวสูตร N₆ ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า lag phase อยู่ในช่วง 0-6 วัน log phase อยู่ในช่วง 6-14 วัน และ stationary phase และ death phase อยู่หลังจากวันที่ 14 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยไปศึกษาการแยกโปรโทพลาสต์ต่อไป

Imbrie - Milligan และ Hodes (1986) และ Imbrie - Milligan และคณะ (1987) แยกโพรโทพลาสต์จาก embryogenic callus ซึ่งได้มาจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของข้าวโพดพันธุ์ inbred A188 ในอาหารที่ประกอบด้วย เคซีนไฮโดรไลเซต น้ำมะพร้าว กรดอะมิโน ในเตรดแคลเซียม และโคเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยนำแคลลัสมาขยายด้วยสารละลายเอนไซม์ นำโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 1×10^6 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารสูตร NN67 คัดแปลงโดยวิธีชั้นเซลล์ที่เลี้ยง (feeder layer) และเซลล์ที่เลี้ยง (nurse cell) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

Imbrie - Milligan และคณะ (1987) รายงานว่าองค์ประกอบของอาหารสูตรคัดแปลงของ MS ที่มี 2,4-D 9.048 ไมโครโมล มายโออินโนซิทอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ หรืออาหารสูตร N_6 ที่มี 2,4-D 4.524 ไมโครโมล เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับข้าวโพดสายพันธุ์ A188 (Kamo และคณะ, 1987)

Saleem และ Cutler (1987) แยกโพรโทพลาสต์จากส่วนของใบข้าวโพดพันธุ์ Market Beauty ที่มีอายุประมาณ 10-15 วัน โดยนำต้นมาไว้ในที่มืด 24-30 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยกโพรโทพลาสต์ ฟอกฆ่าเชื้อใบด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 นาที ชั่งใบหนักประมาณ 0.2 กรัม นำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เพาะเลี้ยงอาหารสูตร Kao ร่วมกับ 0.25 มิลลิตร n-propyl gallate จะมีการสร้างผนังเซลล์ และโพรโทพลาสต์จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 2-3 สัปดาห์

Vasil และ Vasil (1987) แยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ Dekalb XL 82 โดยนำเซลล์แขวนลอยมาขยายด้วยสารละลาย เอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase Onozuka RS 3 เปอร์เซ็นต์ และ pectinase serva 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 7 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.7 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 โมลาร์ และแมนนิทอล 3 มิลลิโมลาร์ MES ที่ pH 5-6 จากนั้นนำโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1-3 \times 10^6$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM คัดแปลงในที่มืด สามารถชักนำให้เกิดเป็นโซมาติก-เอ็มบริโอได้

Kamo และคณะ (1987) แยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์ A188x Black Mexican Sweet โดยนำเซลล์แขวนลอยมา 3-4 กรัมของน้ำหนักสดมาขยายด้วยสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย ไทอามีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.2 โมลาร์ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 80 มิลลิโมลาร์ เซลลูเลส 2 เปอร์เซ็นต์ เพคตินาส 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร PCM โดยวิธีชั้นเซลล์ที่เลี้ยง และย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และสูตร N_6 สามารถชักนำให้เกิดเป็นโซมาติก-เอ็มบริโอได้

Rhodes และคณะ (1988) ได้ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของโพธิโพลาสต์ที่แยกได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพด พบว่าการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงโพธิโพลาสต์ได้ผลดีเมื่อเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อโดยใช้โพธิโพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจากเอ็มบริโอและสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยโพธิโพลาสต์ของข้าวโพดสามารถเจริญบนตัวกรองเหนือเซลล์ชั้นที่เลี้ยงโดยตรงในอาหารเหลว สภาพแวดล้อมเริ่มต้นและการเจริญของชั้นเซลล์ที่เลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญในการได้มาซึ่งประสิทธิภาพ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ โพธิโพลาสต์ถูกย่อยได้จากเซลล์แขวนลอยที่พัฒนามาจากเอ็มบริโอซึ่งให้แคลลัสที่ทนต่อลักษณะแรงดันของการเพาะเลี้ยงในช่วงแรก จากการศึกษาได้ผลดีกับโพธิโพลาสต์ของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ A188 และ B73-1 สามารถเจริญเป็นต้นใหม่จากการเลี้ยงโพธิโพลาสต์ที่แยกได้

Sun และคณะ (1989) สามารถแยกโพธิโพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม Supersweet (sh2sh2) โดยนำเซลล์แขวนลอยมาขยายด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส และเพคโตไลเอส ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ นำโพธิโพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1-3 \times 10^5$ โพธิโพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6P หรือ N_6K โดยวิธีชั้นเซลล์ที่เลี้ยง จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร D19 โดยวิธีมีเซลล์ที่เลี้ยง และไม่มีเซลล์ที่เลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PRM1 และสูตร PRM2 สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร GR-1 จะได้ต้นที่มีระบบรากที่สมบูรณ์

Parker และคณะ (1990) ได้นำแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย แอล-เอสพาราจีน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์แขวนลอยถูกทำให้เจือจาง 1:20 ในอาหารใหม่ศึกษาการเจริญในช่วง 7 วัน พบว่า lag phase ประมาณ 3 วัน log phase ประมาณ 6-7 วัน จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยไปทดสอบความต้านทานกับสาร sethoxymid

การถ่ายยีนโดยใช้ออร์แกนที่เรียบ

ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ ออร์แกนที่เรียบ

Buchanan และ Gibbons ได้ทำการศึกษาเอกสารจัดจำแนกจุลินทรีย์ พบว่าออร์แกนที่เรียบเป็นจุลินทรีย์ที่มีแหล่งอาศัยในดินอยู่ในสกุล *Rhizobiaceae* ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เป็นเชื้อที่มีชีวิตอย่างอิสระในดินหรือน้ำเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ไม่สร้างสปอร์ เมื่อเจริญบนอาหารที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตจะสร้างเมือกที่เป็นน้ำตาลแข็งข้นขึ้นรอบ ๆ เซลล์ โคโลนีไม่มีสี ผิวเรียบ บางสายพันธุ์มีผิวที่ขรุขระ ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญ แต่สามารถเจริญได้ในที่ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนต่ำ เช่นบริเวณบาดแผลของ

เนื้อเยื่อพืช เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.0-9.0 เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปม โดยทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ cortex เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วพบทั้งบนรากและลำต้น

อโครแบคทีเรีย สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (Buchanan and Gibbons, 1974) ดังนี้

1. ใช้กรดอะมิโนไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง

3-ketolactose

- 1.1 ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *A. tumefaciens*
- 1.2. ไม่ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *A. radiobacter*

2. ไม่ใช้กรดอะมิโนไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง

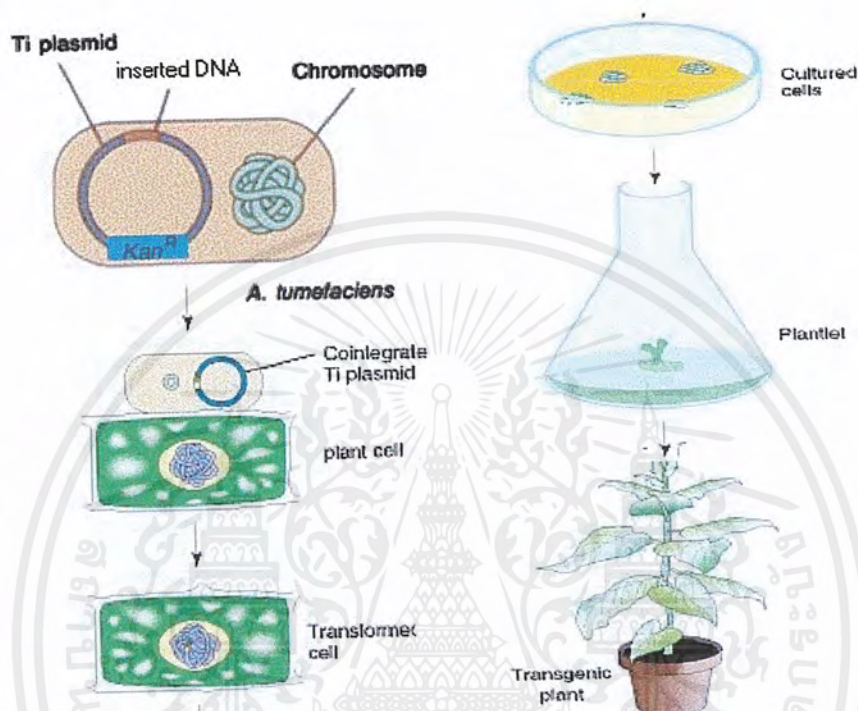
3-ketolactose

- 2.1. ทำให้เกิดรากฝอย คือ *A. rhizogenes*
- 2.2. ทำให้เกิดปุ่มปมบนรากเบอร์รี่ คือ *A. rubi*

อโครแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียซึ่งอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้นเรียกว่า crown gall disease เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมนั้นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถคงสภาพเช่นเดิมอยู่ได้ คือ เจริญเติบโตได้เร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใด แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เนื้อเยื่อดังกล่าวนี้จะสร้างสารพวกโอปีน (opine) ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของกรดอะมิโนที่พบได้ไม่บ่อยนัก สารโอปีนที่เซลล์สร้างขึ้นนี้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่บุกรุกพืช ที่พบมากคือ ออกโทปีน (octopine) และ โนปาไลน์ (nopaline) สารโอปีนที่เซลล์พืชสร้างขึ้นนี้จะเป็นอาหารของแบคทีเรียอโครแบคทีเรีย นั่นอีกต่อหนึ่ง

หลังจากเซลล์พืชเปลี่ยนสภาพ ไปเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมและผลิตสาร โอปีนแล้วจะไม่ต้องการเชื้อ อโครแบคทีเรียอีก กลไกที่ทำให้เกิดสภาพเช่นนี้พบว่ามีสาเหตุมาจาก พลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140-235 กิโลเบส ที่พบในอโครแบคทีเรีย จึงเรียกพลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด Ti (tumour inducing plasmid) เชื้ออโครแบคทีเรียที่พบ พลาสมิดชนิดนี้ คือ *Agrobacterium tumefaciens* เชื้ออโครแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งทำให้เกิดรากบริเวณที่มีการบุกรุกของแบคทีเรีย คือ *Agrobacterium rhizogenes* ซึ่งมีพลาสมิด Ri (Root inducing plasmid)

เนื้อเยื่อที่เน่าเปื่อยที่เกิดจากการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens* จะมีดีเอ็นเอ บางส่วนของ พลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายทอดเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช ดังรูปที่ 1. เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า ทีดีเอ็นเอ (Transferred DNA)



รูปที่ 1. แสดงการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens* ทำให้เนื้อเยื่อเกิดโรคเน่าเปื่อยในพืช

พลาสมิด Ti ที่พบมากมี 2 ชนิดคือ ชนิดออกโทปิน และ โนปาไลน์ มีส่วนของยีน virulence (vir gene) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งทีดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์พืช ทีดีเอ็นเอซึ่งภายในมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปิน เช่น nopaline synthase (nos), agroclonopine synthase (acs), octopine synthase (cos) และ agropine synthesis ส่วนอื่นๆคือ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล (ori) ส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลาสมิดโดยวิธี conjugation (tra) ยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารบางชนิดเป็นแหล่งพลังงานได้ ได้แก่ arginine catabolism (arc), nopaline catabolism (noc), agroclonopine catabolism (acg), octopine catabolism (occ) และ agropine catabolism (agr) เมื่อแบคทีเรียส่งทีดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจะสามารถสร้างสารโอปินขึ้นได้ตามเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของ พลาสมิด Ti นั้น ส่วนอโครแบคทีเรียก็สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สาร โอปิ่นที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากที่ติเอ็นเอมีเอ็นที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสาร โอปิ่นดังกล่าว เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไป พืชจะยังคงสังเคราะห์สาร โอปิ่นได้ เนื่องจาก ถูกส่งเข้าไปในเซลล์พืชอย่างถาวร

ในส่วนของ ที่ติเอ็นเอนอกจากจะมีเอ็นที่กำหนดการสังเคราะห์สาร โอปิ่นแล้วยังมีเอ็นที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนินด้วย เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับที่เอ็นเอมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว และไม่จำกัด เกิดเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ เอ็นที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่พบคือ tryptophan monooxygenase (tms 1), indoleacetamide hydrolase (tms 2) และ isopentenyl transferes (tmr) โดย 2 เอ็นแรกกำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสาร tryptophan เป็น indoleacetamide และเปลี่ยนต่อไปเป็น indoleacetic acid ซึ่งเป็นสารพวกออกซิน ส่วนเอ็น tmr เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้าง isopentenyl adenosine ซึ่งเป็นสารพวก ไซโตไคนิน ถ้าเอ็น tms เกิดการกลายพันธุ์ (tms-) จะทำให้เนื้อเยื่อปุ่มปมนั้น เกิดการพัฒนาเป็นยอด (tumour morphology shoot) แต่ถ้าเอ็น tmr เกิดการกลายพันธุ์ (tmr-) เนื้อเยื่อนั้นจะพัฒนาไปเป็นราก

ขอบเขตของที่ติเอ็นเอที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) 25 คู่เบส 2 ข้างของที่ติเอ็นเอเรียกว่า left border (LB) และ right border (RB)

กลไกการส่งที่ติเอ็นเอเข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีน vir gene ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วยยีนตำแหน่งต่างๆดังนี้

vir A มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุม โดยจดจำสารประกอบพวก ซึ่งผลิตจากพืชและไปกระตุ้นยีน vir G

vir G มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมเช่นเดียวกัน โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่นๆในกลุ่ม

vir D จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของที่ติเอ็นเอที่จุดขอบเขตทางขวาและซ้ายของที่ติเอ็นเอ คือ LB และ RB ทำให้เกิดที่ติเอ็นเอสายเดี่ยว สำหรับส่งไปยังเซลล์พืช

vir C เกี่ยวข้องกับการกำหนดสายพันธุ์ของแบคทีเรียและชนิดของพืชที่จะเข้าบุกรุก(host range determination) แต่ยังไม่ทราบว่าวิธีวิธีการอย่างไร

vir E เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับติเอ็นเอ สายเดี่ยวเพื่อให้ที่ติเอ็นเอมีความคงตัว ในระหว่าง และหลังจากที่มีการส่งถ่ายยีน

vir B ยังไม่ทราบหน้าที่

กลไกการส่งถ่ายยีนโดยรวม คล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ (conjugation) ของแบคทีเรีย กระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบฟีนอลิกจากพืช คือ อะซิโตไซลิงโกน (acetosyringone) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และ *vir* gene ที่อยู่บนพลาสมิด Ti โดยที่ติเอ็นเอจะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *vir D* ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบติเอ็นเอสายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางขวา ไปเรื่อยๆ ส่วนขอบเขตทางขวานี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่งที่ติเอ็นเอ ส่วนขอบเขตทางซ้ายทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้นติเอ็นเอที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าจะไม่มีส่วนขอบเขตทางซ้าย การส่งที่ติเอ็นเอสายเดียวก็น่าจะเกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอนเพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม กระบวนการที่เกิดขึ้นโดยละเอียดอธิบายได้ดังนี้

1. ผลผลิตของยีน *chv A* และ *chv B* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปเกาะกับเซลล์ของพืชที่มีบาดแผล
2. พืชสังเคราะห์สารอะซิโตไซลิงโกน แล้วปล่อยเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย
3. โปรตีนจากยีน *vir A* จัดจำแนกอะซิโตไซลิงโกนได้ และร่วมกับสารนี้ไปกระตุ้นให้ยีน *vir G* ทำงาน
4. สารอะซิโตไซลิงโกน และโปรตีนจากยีน *vir G* ไปกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนที่เหลือ
5. โปรตีนจากยีน *vir D* ซึ่งเป็นเอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเอส ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่งขอบเขตทางขวาและซ้าย
6. เกิดติเอ็นเอสายเดี่ยว
7. ติเอ็นเอสายเดี่ยวเข้าไปในเซลล์พืชและไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช
8. เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ในส่วนของติเอ็นเอ
9. สารออกโทปินเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย
10. สารออกโทปินไปเหนี่ยวนำให้เกิดการลอกรหัสของยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เพื่อใช้สารนี้เป็นแหล่งพลังงาน และยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายพลาสมิดให้แก่แบคทีเรียด้วยกัน (*Tra*)
11. แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ โดยใช้สารออกโทปินเป็นแหล่งพลังงาน และเกิดกาจับคู่ระหว่างแบคทีเรียเพื่อถ่ายพลาสมิด Ti ให้แก่เซลล์ที่ไม่มี

ข้อสังเกตที่น่าสนใจ คือยีนที่อยู่ในติเอ็นเอทั้งหมดนั้นเป็นยีนของพืชที่อยู่ในพลาสมิดของแบคทีเรีย ยีนเหล่านี้มีโปรโมเตอร์ซึ่งเหมือนกับโปรโมเตอร์ของพืช และมีส่วนเทอร์มินเตอร์

และตำแหน่งที่ใช้เติมเบสโพลีเอ (poly A) ที่พบในยูคาริโอท ยีนเหล่านี้ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ของอโครแบคทีเรียแต่แสดงออกในเซลล์ของพืชที่ได้รับทีดีเอ็นเอ เมื่อยีนเหล่านี้แสดงออกแล้วมีผลไปเหนี่ยวนำให้ยีนในเซลล์แบคทีเรียทำงานได้ และเป็นประโยชน์ต่อเซลล์แบคทีเรีย

ส่วนสำคัญที่ทำให้มีการส่งทีดีเอ็นเอจาก อโครแบคทีเรียไปยังพืชคือ ส่วนของ *vir gene* และตำแหน่งขอบเขตทางขวาและซ้าย ของทีดีเอ็นเอ ส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีนและฮอร์โมนพืชที่อยู่ภายในทีดีเอ็นเอนั้น ไม่มีหน้าที่ในการส่งถ่ายทีดีเอ็นเอ แต่อย่างใด ดังนั้นการใช้พลาสมิด Ti เป็นเวกเตอร์สำหรับถ่ายฝากยีนให้กับพืชจะทำโดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและสาร โอปีนด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อมีการส่ง ทีดีเอ็นเอเข้าไปในพืช พืชก็จะได้รับยีนที่สอดใส่ไว้แทน แต่เนื่องจากพลาสมิด Ti เป็นพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 200 กิโลเบส การเตรียมพลาสมิด การตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าไปในพลาสมิดทำได้ยาก พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่มาก โอกาสที่จะพบตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดๆ เพียง 1 ตำแหน่ง เป็นไปได้ยากหรือแทบจะไม่มีเลย พบว่า *vir gene* มีผลต่อการส่งยีนที่อยู่ระหว่างขอบเขตทางขวาและซ้ายได้โดยไม่จำเป็นต้องมีตำแหน่งอยู่ใกล้หรืออยู่บนพลาสมิด โมเลกุลเดียวกันกับส่วนของยีนที่อยู่ระหว่างขอบเขตทางขวาและซ้ายนั้น การสร้างเวกเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนผ่านอโครแบคทีเรียจึงมี 2 แบบ คือ

- ก. **Binary vector** เวกเตอร์แบบนี้แยกเอาส่วนของขอบเขตทางขวาและซ้าย มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 10 กิโลเบส ส่วน *vir gene* ยังคงอยู่ในพลาสมิด Ti ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งอยู่ในอโครแบคทีเรียระหว่าง ขอบเขตทางขวาและซ้าย ซึ่งอยู่ในพลาสมิดเล็กนั้นประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในพืช และตำแหน่งที่ใช้สอดใส่ยีน เพื่อใส่ยีนที่ต้องการลงไป ส่วนนอกของพลาสมิดประกอบด้วยจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลในอโครแบคทีเรียและ *E. coli* ยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในเซลล์แบคทีเรีย เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* เมื่อตัดต่อยีนที่ต้องการลงในตำแหน่งภายในขอบเขตของทีดีเอ็นเอเดิมแล้วนำมาใส่ใน *E. coli* แล้วจึงถ่าย พลาสมิดจาก *E. coli* ไปสู่อโครแบคทีเรียที่มีพลาสมิด Ti แต่เป็นพลาสมิดที่ไม่มีส่วนของ ทีดีเอ็นเอเมื่อนำอโครแบคทีเรียที่มีพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดนี้ไปปลูกเซลล์พืช จะมีการส่งชิ้นดีเอ็นเอ ตั้งแต่ส่วนขอบเขตทางขวาดังซ้าย ซึ่งรวมเอายีนที่ต้องการ และยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืชเข้าไปในเซลล์พืช โดยการทำงานของ *vir gene* และยีนจากโครโมโซมของอโครแบคทีเรีย

ข. **Cointegrate vector** เวกเตอร์แบบนี้ทำโดยตัดเอาส่วนของยีนที่ทำหน้าที่ สร้าง
 สอร์โบนพีชและสารโอปีนบางส่วนออกไปจากทีดีเอ็นเอของพลาสมิด Ti แล้ว
 แทนที่ด้วย ดีเอ็นเอ ที่มาจากพลาสมิดของ *E. coli* และมีพลาสมิดขนาดเล็กอีก
 อันหนึ่ง ประกอบด้วยยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในแบคทีเรีย ยีนเครื่องหมายที่
 ใช้คัดเลือกในพืช บริเวณที่จะสอดใส่ยีนที่ต้องการและจุดเริ่มต้นของการจำลอง
 โมเลกุลใน *E. coli* เท่านั้น เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli* เมื่อ
 ตัดต่อยีนที่ต้องการลงในตำแหน่งที่ใช้โคลนยีนแล้ว จึงถ่ายพลาสมิดลงใน *E. coli*
 และถ่ายพลาสมิดไปยัง อโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด Ti แบบที่อธิบายไว้ตอนต้น
 เนื่องจากพลาสมิดเล็กที่ใช้โคลนยีนนี้ไม่มีจุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุลในอโกร
 แบคทีเรียจึงไม่สามารถคงอยู่อย่างอิสระได้ เนื่องจากในส่วนของ ทีดีเอ็นเอของพ
 ลาสมิด Ti มีส่วนของดีเอ็นเอจากพลาสมิดของ *E. coli* อยู่ ดังนั้นจะเกิดรีคอมบิเน
 ชัน ทำให้พลาสมิดเล็กที่ใส่เข้าไปอยู่ภายในขอบเขตของทีดีเอ็นเอทั้งหมด เมื่อนำอ
 โกรแบคทีเรียนี้ไปปลูกเซลล์พืช อโกรแบคทีเรียจะส่งยีนทั้งหมดที่อยู่ภายใน
 ทีดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าไปในเซลล์พืช

กลไกการย้ายยีนของ *A. tumefaciens*

ในการศึกษากลไกของอโกรแบคทีเรียมนี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอโกรแบคทีเรีย
 ในปี 1979 Ohyama และคณะ ศึกษาพบว่าหลังจากที่มีการปลูกเชื้อบนชิ้นส่วนพืชแล้ว แบคทีเรียจะ
 ใช้เวลาประมาณ 20–60 นาที ในการเชื่อมติดกับเซลล์พืช ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของพืชและวิธีการ
 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเชื่อมติดไม่ต้องการ Ca^{2+} และถ้ามีจะเกิดการยับยั้งการเชื่อมติด
 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25–30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 6.0

รูปแบบของการติดของเชื้ออโกรแบคทีเรียโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการยึดเกาะ
 ของอโกรแบคทีเรีย กับขาสืบและมะเขือเทศ ดังแสดงในรูปที่ 2. คือ

ระยะที่ 1 แบคทีเรียจะยึดเกาะที่ตำแหน่งเป้าหมาย (Receptor = R) ที่จำเพาะบนผิวของ
 เซลล์พืช

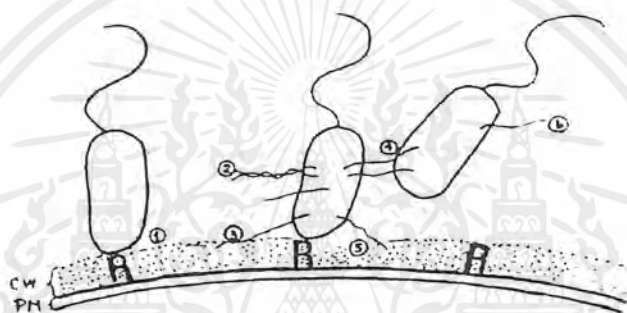
ระยะที่ 2 หลังจากเกิดการยึดเกาะแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยเซลลูโลส

ระยะที่ 3 เส้นใยเซลลูโลสจะยึดเกาะแบคทีเรียที่ผิวของผนังเซลล์ (Cell wall) ซึ่งพืชไม่
 สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและแยกแบคทีเรียออกจากเซลล์พืชได้

ระยะที่ 4 เส้นใยที่มีความยาวจะยึดกับแบคทีเรียตัวอื่น

ระยะที่ 5 แบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชจะปล่อยเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของพืช ทำให้เกิดการสัมผัสระหว่างแบคทีเรียกับพลาสมาเมมเบรน (PM) ของเซลล์พืช ต่อมาจะทำให้เกิดการเคลื่อนย้าย Ti plasmid จากแบคทีเรียไปสู่เซลล์พืช

ระยะที่ 6 แบคทีเรียที่ถูกจับโดยเส้นใยจะมีการสร้างเส้นใยอีกด้วยตัวเองทำให้มีการยึดเกาะทางอ้อมกับเซลล์พืชและเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชผ่านตำแหน่งเป้าหมายและเส้นใยเซลล์โฮสต์



รูปที่ 2 แบบจำลองการยึดเกาะของ *A. tumefaciens* ตัวเลขในวงกลมแสดงถึงระยะต่าง ๆ

Ti plasmid ประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) ดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ข้อแตกต่างกันคือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะบางประการเพื่อทำให้การคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนโดยการถ่ายฝากให้สามารถแยกออกได้โดยง่ายเพื่อใช้ตรวจสอบผลของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และสามารถแสดงออกได้มากน้อยเพียงไรในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใด ในพืชยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลอาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบว่าทำงานได้ตลอดเวลาในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะต่ออยู่กับส่วนของ DNA ที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์

ตารางที่ 2. แสดงตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช

ยีนเครื่องหมาย	เอนไซม์ที่สร้างได้	ลักษณะที่แสดงออก
Hpt	Hygromycin phosphotransferase	ต้านทานไฮโกรไมซิน
Dhfr	Dihydrofolate reductase	ต้านทาน methotrexate
CAT	Chloramphenical acetyltransferase	ต้านทานคลอแรมเฟนิคอล
NPT II	Neomycin phosphotransferase	ต้านทานกานามัยซิน
Aro A	5-enolpyruvul shilimate-3-phosphate synthase	ต้านทานไกลโฟเสต

ตารางที่ 3. แสดงตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

ยีนรายงานผล	เอนไซม์ที่สร้างได้
CAT	Chloramphenical acetyltransferase
GUS	Beta-glucuronidase
Nos	Nopaline synthase
Luc	Luciferase
β -gal	Beta-galactosidase

โปรโมเตอร์ที่ใช้ในพืชกันมากคือ โปรโมเตอร์จากยีน Nopaline synthase (nos promoter) ซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA ของ Ti plasmid และโปรโมเตอร์จากไวรัสของกะหล่ำ cauliflouer mosaic virus (CaMV 35 S promoter)

Kathleem D' H และคณะ (1992) ได้ทำการย้ายยีนโดยใช้พลาสมิด pDE 108 ในข้าวโพดพันธุ์ H99 และ Pa91 เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในที่มีดที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในอาหาร N_6 (Chu และคณะ, 1975) ที่ประกอบด้วย เกซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรีติน 6 มิลลิโมล MES 0.5 กรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 1.6 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วย แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัมต่อลิตร pH 5.8 พบว่ารุ่นลูกจะได้รับยีนด้านทานสารกานาไมซิน เป็นไปตามกฎของเมนเดลและแคลัสที่ได้รับการย้ายยีนแล้วจึงคัดเลือกในอาหารที่ประกอบด้วยสารกานาไมซิน

Halluin และคณะ (1992) ได้ทำการย้ายยีนโดยวิธีอิเล็กโตรโพลีเซชัน ใช้พลาสมิด pDE 108 ในข้าวโพดพันธุ์ H99 และ Pa91 โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในที่มีดที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในอาหาร N_6 ที่ประกอบด้วย เกซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรีติน 6 มิลลิโมล MES 0.5 กรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 0.75 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 1.6 กรัมต่อลิตร เติมนิกโคตินิกแอซิด 0.75 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5.8 พบว่าแคลัสที่ได้รับการย้ายยีนจะสามารถต้านทานต่อสารกานาไมซิน

Sukhapida K. และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองแยกโพรโทพลาสต์จากไมโครสปอร์ของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet และโพรโทพลาสต์ที่ได้รับพลาสมิด pDAB199 ที่ประกอบด้วยยีน *gusA* และ *nptII* พบว่าแคลัสที่เกิดการย้ายยีนแล้วจะถูกคัดเลือกในอาหารที่ประกอบด้วยสารกานาไมซินและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Jeanette และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองแยกโพรโทพลาสต์จากไมโครสปอร์ของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet และโพรโทพลาสต์ที่ได้รับพลาสมิด pDAB199 ที่ประกอบด้วยยีน *gusA* และ *nptII* พบว่าแคลัสที่เกิดการย้ายยีนแล้วจะถูกคัดเลือกในอาหารที่ประกอบด้วยสารกานาไมซินและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

Jeanette L. Rasmussen และคณะ (1994) ได้ศึกษาการย้ายดีเอ็นเอของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α และอโกแบคทีเรีย สายพันธุ์ A208 โดยวิธีการไมโครโปรเจกไทล์นำดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์แขวนลอยของยีสสายพันธุ์ NT1 และข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet โดยเตรียมแบคทีเรียด้วยฟีนอลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนซึ่งใช้หัวเชื้อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเหลว LB ที่ทำการดูกลืนแสง 0.02-0.05 ที่ 600 นาโนเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนโดยตรวจสอบจากยีน GUS ที่ใช้เป็นพาหะ

Brigitte K และ Horst Lorz (1995) ได้ทำการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ และเพคตินเอส 23 0.078 เปอร์เซ็นต์ และถูกผสมของไมโครสปอร์ของข้าวโพดหลายสายพันธุ์ นำโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 1.5×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 10 กรัม และสามารถชักนำโพรโทพลาสต์ข้าวโพดถูกผสม H99 กับ FR-16-I ให้พัฒนาเป็นแคลลัสและชักนำให้เป็นต้นได้

Welter และคณะ (1995) ได้ศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอข้าวโพดพันธุ์ Hi-II ไปเป็นแคลลัสหลาย ๆ ตัวอย่างโดยการใช้เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ครั้งในกลูตาโรลดีไฮด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนอาหาร N_6 โดย 7 วันแรกจะให้ความเข้มแสงต่ำเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นจะให้ความเข้มแสงสูงระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเอ็มบริโอของข้าวโพดที่พัฒนาไปเป็นแคลลัสชนิด friable ประกอบไปด้วยลักษณะรูปร่างหลายแบบในช่วงต่าง ๆ ระหว่างการเปลี่ยนอาหาร จะทำให้ได้แคลลัสที่มีรูปร่างชนิด type II 3 แบบ ได้แก่ pre-embryogenic early-embryogenic และ late-embryogenic แคลลัสถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ของการพัฒนาและการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ทำให้ทราบว่าลักษณะรูปร่างทั้ง 3 แบบ สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้โดยผ่าน somatic embryogenesis

Marie-Francoise J. และคณะ (1995) ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด DNA และการแสดงออกของ β -glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพดโดยวิธีอิเล็กโตรโพลีเซชัน พบว่าสามารถนำ DNA อิสระเข้าไปในไมโครสปอร์ของข้าวโพดถูกผสมได้ ซึ่งการเลือกสารละลายสำหรับทำอิเล็กโตรโพลีเซชันพิจารณาจากความสามารถที่ให้การเจริญเป็นต้นใหม่ได้จำนวนมาก การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีโอไทด์เอสถูกยับยั้งโดยการเพิ่มโปแตสเซียมไนเตรตและแมกนีเซียมซัลเฟต 100 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายสำหรับทำอิเล็กโตรโพลีเซชัน การแสดงออก 7 ลักษณะของเวกเตอร์ ได้แก่ ยีนรายงานผล Uid A ที่ถูกควบคุมโดยโมเชอิคไวรัสของดอกกะหล่ำ ยีน Lat 52-7 Zmg 13 Emu Ubig-1 Al หรือยีนโพรโมเตอร์ Act 1 ใช้ทดสอบความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ β -glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพด ระดับการแสดงออกสูงสุดเมื่อยีน Uid A ถูกขับโดยยีนโพรโมเตอร์ Act 1 ดังนั้นเวกเตอร์ตัวนี้จึงมีการใช้ต่อไปเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ระดับการแสดงออกของ β -glucuronidase สูงสุด

Wan และคณะ (1995) ศึกษาการย้ายยีนโดยวิธี microprojectile bombardment เข้าสู่แคลลัสของข้าวโพดได้สำเร็จ

Yuji และคณะ (1996) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์ A188 โดยการย้ายไออนีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA 4404 (pSB 131) สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยเลี้ยงในอาหาร LSD ที่เติมยาปฏิชีวนะ phosphinothricin และทดสอบการ

แสดงออกของยีนก็ส พบว่ามีการแสดงออกของยีน และ การทำ southern blot เพื่อยืนยันว่า สามารถย้ายยีนได้จริง

Jaime M. Humara , marian Lopez และ Ricardo J. Ordas (1999) ทำการย้ายยีน β -glucuronidase (*uid A*) เข้าสู่ต้นสนหิน (*Pinus pinea L.*) ด้วยเครื่องยิงยีนโดยใช้การยิงอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสมิด pBI 121 จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค 1.0 ไมโครเมตร ความเข้มข้น 0.8 ไมโครกรัม ยิงเข้าสู่เนื้อเยื่อส่วน cotyledons ที่เลี้ยงได้อายุ 1 วัน การยิงยีนจะใช้แรงดันของก๊าซฮีเลียมที่ 6.2 เมกะพาสคาล ระยะห่างจากวัตถุ 6 เซนติเมตร ในการตรวจสอบด้วยวิธี GUS fluorometric assays โดยพบว่าการแสดงออกของยีนจะถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S

David A. Selinger และ Vicki L. Chandler. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของข้าวโพด โดยใช้ยีนของเมล็ดเป็นเกณฑ์พิจารณา ซึ่งควบคุมด้วยยีน *pal aleurone color 1 (pac1)* ซึ่งจะไปควบคุมการสังเคราะห์ anthocyanin ของ RNA การทดลองดังกล่าว ได้ทำการย้ายยีน *pac1-ref* เข้าสู่เนื้อเยื่อของข้าวโพดโดยใช้เครื่องยิงยีนพบว่าสามารถลดปริมาณของ anthocyanin ได้

Wesley Bruce , Otto Folkerts , Carl Garnaat , Oswald Crasta , Brad Roth , and Ben Bowen (2000) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุม Flavonoid pathway ในข้าวโพดยีนดังกล่าวจะควบคุมโดย Estradiol-Inducible transcription Factors CRC and P ซึ่งจะใช้เครื่องยิงยีน (particle gun bombardment) ในการย้ายยีน CRC และ ER-C1 เข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet โดยใช้พลาสมิด PHP610 PHP594 และ PHP6417 เป็นเวกเตอร์ในการย้ายยีน โดยเนื้อเยื่อที่ใช้ที่ใช้จะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ซึ่งประกอบด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที แล้วเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

Tibor Peoham และคณะ (2000) ทำการทดลองใช้เครื่องยิงยีนในการย้ายยีน *mir 1* ลงในแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์ Black Mexican Sweet โดยใช้พลาสมิด pAHC 25 เป็นเวกเตอร์ในการย้ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวโพด จากการทดลองดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของหนอนเจาะฝักข้าวโพด พวก Lepidoptera ได้ถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเกิดการสะสมของ Unique 33-KD Cystein Proteinase ซึ่งจะมีผลกระทบต่อหนอนดังกล่าว

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ฝักข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 (Zea mays L.)
2. เชื้ออโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*)
 - 2.1. สายพันธุ์ AGL-1
 - 2.2. สายพันธุ์ LBA 4404
 - 2.3. สายพันธุ์ EHA 105
3. สารเคมี
 - 3.1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็งสูตร N₆ และ MS
 - 3.2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LB
 - 3.3. สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอโรกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)
 - 3.4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D NAA ซิเอติน ไคเนติน และ BAP
 - 3.5. กรดอะมิโน ได้แก่ แอล-โพรลีน และ เลซีนไฮโดรไลเซต
 - 3.6. เอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ แอลกอฮอล์ 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์
 - 3.7. อะซิโตไซลิ่งโกน
 - 3.8. ไฮโกรมัยซิน
 - 3.9. ไฮโฟเทกซิม
 - 3.10. สารละลาย GUS-buffer
4. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ
 - 4.1. ปีกเกอร์
 - 4.2. ขวดรูปชมพู่
 - 4.3. ปีเปตต์
 - 4.4. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 4.5. จานแก้ว
 - 4.6. แท่งแก้วคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.7. กระบอกตวง
- 4.8. มีดผ่าตัด
- 4.9. ปากคืบ
- 4.10. อะลูมิเนียมฟลอย
- 4.11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 4.12. ตู้ปลอดเชื้อ
- 4.13. เครื่องเขย่า
- 4.14. ไมโครเวฟ
- 4.15. ตู้บ่มเชื้อ
- 4.16. ไมโครปิเปต และ ทิป ขนาดต่างๆ
- 4.17. อุปกรณ์การกรองแบบที่เรียและแผ่นกรองแบบที่เรีย
- 4.18. หม้อนึ่งความดัน
- 4.19. ตู้อบ
- 4.20. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
- 4.21. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ
- 4.22 .เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- 4.23 .กล้องสเตอริโอ
- 4.24 .กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ภาพ
- 4.25. เครื่องยิงปืน

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคล์สของข้าวโพดพันธุ์ อินทรี 2

1. นำฝักข้าวโพดที่มีอายุ 14 วันหลังจากการผสมเกสรมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยแช่ฝักข้าวโพดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่เติมคลอโรกซ์ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ สารเปียกใบ 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

2. ใช้ปลายมีดแกะเอ็มบริโอของข้าวโพดออกมา แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีความเข้มข้นของ NAA 3 ระดับ(ตารางที่ 4) ทุกสูตรมีส่วนประกอบของ 2,4-D 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำไปบ่มในที่มืดที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการตัดยอดและรากออก แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม
4. เลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน วัดค่าการเจริญเติบโตของแคลลัสแล้วบันทึกผล

ตารางที่ 4. แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นแคลลัส

ฮอร์โมน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
	$N_6 1$	$N_6 2$	$N_6 3$	$N_6 4$	$N_6 5$	$N_6 6$	$N_6 7$
2,4-D	2	2	2	2	2	2	2
NAA	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

การทดลองที่ 2. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด

1. เตรียมอาหารสูตร N_6 และ MS ที่ใช้ในการชักนำแคลลัสของข้าวโพดให้เจริญเป็นต้นใหม่ โดยอาหารแต่ละสูตรจะมีส่วนประกอบของอาหารและความเข้มข้นของฮอร์โมนต่างกัน 8 ระดับ (ตารางที่ 5) ทุกสูตรมีส่วนประกอบของ แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และเทอาหารแต่ละสูตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อให้มีความหนาพอสมควร

2. นำแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงมาเป็นเวลา 21 วัน มาทำการตัดยอดและรากเดิมออก

3. นำแคลลัสที่ผ่านการตัดยอดและรากเดิมออกแล้วมาเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้

ข้างต้นโดยนำแคลลัสใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแต่ละสูตร สูตรละ 10 แคลลัส

4. นำไปเลี้ยงต่อในที่มืดแสงสว่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

5. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 5. แสดงค่าความเข้มข้นของสารประกอบต่าง ๆ ในอาหารสูตร N₆ และ MS ที่ใช้ในการ
ชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด

สูตร อาหาร	ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของไฟตาเจล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของซีเอดิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
N ₆	0.25	2.60	0.50
		2.60	1.00
		5.20	0.50
		5.20	1.00
	0.50	2.60	0.50
		2.60	1.00
		5.20	0.50
		5.20	1.00
MS	0.25	2.60	0.50
		2.60	1.00
		5.20	0.50
		5.20	1.00
	0.50	2.60	0.50
		2.60	1.00
		5.20	0.50
		5.20	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคล์สของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

ในการหาความต้านทานของเอ็มบริโอของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี จะใช้เอ็มบริโอที่มีอายุ 1 วัน และแคล์สของข้าวโพดอายุ 7 วัน ในการทดสอบ โดยที่จะใช้ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ที่แตกต่างกัน 6 ความเข้มข้นคือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทดสอบว่าที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เอ็มบริโอและแคล์สไม่สามารถเจริญเติบโตได้

1. เตรียมอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ซึ่งมีความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ในระดับที่ต่างกัน 6 ระดับคือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 6)

2. นำเอ็มบริโออายุ 1 วัน และแคล์สอายุ 7 วันมาใส่ในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับที่ต่างกันระดับละ 10 เอ็มบริโอหรือ 10 แคล์ส

3. นำไปเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

4. สังเกตผลของไฮโกรไมซิน บี ว่าที่ความเข้มข้นใดที่ทำให้เอ็มบริโอ และแคล์สไม่สามารถเจริญได้

5. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 6. แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคล์สต่อไฮโกรไมซิน บี

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$N_6 1$	0
$N_6 2$	10
$N_6 3$	20
$N_6 4$	30
$N_6 5$	40
$N_6 6$	50

การทดลองที่ 4. การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้โกรแบคทีเรีย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้ยีนจากโกรแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ของข้าวโพด ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ อายุของเอ็มบริโอ ความเข้มข้นของสารละลายเชื้อโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และ สายพันธุ์ของเชื้อโกรแบคทีเรีย (ตารางที่ 7)

1. เลี้ยงเชื้อโกรแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404

2. นำเอ็มบริโอที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน โดยนำมาตัวอย่างละ 20 เอ็มบริโอมาใส่ในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนประกอบของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA (จากการทดลองที่ 1) แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เลซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัม และอะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้นสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. นำมาหยดเชื้อโกรแบคทีเรีย ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ที่ OD 0.01 และ 0.1 แคลต์สละ 30 ไมโครลิตร

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้อโกรแบคทีเรียเจริญ

5. นำเอ็มบริโมาล้างฆ่าเชื้อโกรแบคทีเรียด้วยโซโฟแทกจินที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 2 ครั้ง

6. แยกเอ็มบริโอตัวอย่างมาตัวอย่างละ 10 เอ็มบริโอมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS โดยใช้ GUS-buffer ส่วนอีก 10 เอ็มบริโอนำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง(จากการทดลองที่ 2) ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยมีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้น (จากการทดลองที่ 3) เพื่อตรวจสอบดูความต้านทานของข้าวโพดที่มีต่อไฮโกรไมซิน บี

7. ตรวจสอบผลของการย้ายยีนโดยการสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนเอ็มบริโอ

8. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 7. แสดงความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนและสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนดขึ้นในการทดสอบ
หาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์

เชื้ออโกรแบคทีเรีย	อายุของเอ็มบริโอ (วัน)	ความเข้มข้นของ เชื้ออโกรแบคทีเรีย (OD)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
สายพันธุ์ AGL-1	1	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	3	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	5	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	7	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
สายพันธุ์ EHA 105	1	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	3	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	5	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	7	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100

เชื้ออโกรแบคทีเรีย	อายุของเอ็มบริโอ (วัน)	ความเข้มข้นของเชื้ออโกรแบคทีเรีย (OD)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิ่งโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
สายพันธุ์ LBA 4404	1	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	3	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	5	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100
	7	0.01	50 / 100
		0.1	50 / 100

การทดลองที่ 5. การศึกษาการย้ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีน (Particle gun bombardment)

การใช้เครื่องยิงอนุภาคในการย้ายยีนจากภายนอกเข้าไปในเซลล์พืชสามารถทำได้โดยตรงโดยการยิงอนุภาคโลหะขนาดเล็ก (1.0-1.6 ไมโครเมตร) เช่น อนุภาคทองคำ หรือ ทังสเตน ซึ่งเคลือบด้วยพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการ การเคลื่อนที่ของอนุภาคเกิดจากแรงดันของก๊าซฮีเลียม โดยจะต้องวางตัวอย่างพืชที่ต้องการจะย้ายยีน เช่น เนื้อเยื่อเจริญต่าง ๆ เอ็มบริโอ แคลลัส และเซลล์แขวนลอย เป็นต้น ไว้ด้านล่างบริเวณ target shelf ของเครื่องยิงยีน

ขั้นตอนการเตรียมอนุภาคที่ใช้ในการยิงยีน

1. ละลายอนุภาคทังสเตน หรือ ทองคำ 30 มิลลิกรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute ethanol) 500 ไมโครลิตร นำไปปั่น 1 นาที และกลับหลอดไปมาเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ดูดสารละลายอนุภาคทังสเตน หรือ ทองคำ ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 35 ไมโครลิตร
3. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบที่สูงที่สุด และดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง
4. ละลายสารละลายอนุภาคทังสเตน หรือ ทองคำด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 200 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบที่ 2000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป
5. ละลายสารละลายอนุภาคทังสเตน หรือ ทองคำในสารละลายพลาสมิดซีเอ็นเอ

(plasmid DNA solution) 15 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 220 ไมโครลิตร สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ 250 ไมโครลิตร และสารละลายสเปอร์มีดิน 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมเป็นเวลา 15 นาที

6. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นและลง ทำในน้ำแข็ง
7. ปั่นผสมในที่เย็นอย่างน้อย 10 นาที
8. ปั่นเหวี่ยง 500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสออก
9. ใช้ไมโครปิเปตดูดเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 36 ไมโครลิตร ในที่เย็นเพื่อละลายดีเอ็นเอ
10. ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 1 นาที เพื่อกำจัดเอทิลแอลกอฮอล์
11. ดูดดีเอ็นเอที่เตรียม 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในหัวฉีด (microcarrier) ที่แห้งสนิท

ขั้นตอนการย้ายชิ้นในจ้าวโศดโดยเครื่องยิงปืน

1. ทำความสะอาดเครื่องยิงปืนด้วยใช้เอทิลแอลกอฮอล์เช็ดให้ทั่ว และปิดประตูเครื่องให้สนิท (เครื่องจะต้องอยู่ในตู้ปลอดเชื้อ)
2. นำส่วนประกอบและอุปกรณ์ ได้แก่ rupture dish และ stopping screen ที่เป็นสแตนเลสขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร มาฆ่าเชื้อในเอทานอลและย้ายมาใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่มีแผ่นกรอง และผึ่งให้แห้ง
3. นำแผ่น rupture dish มาใส่ใน rupture dish retaining cap
4. นำแผ่น macrocarrier มาวางลงบนด้านในของวงแหวน macrocarrier holder แล้วใช้ท่อพลาสติกกดแผ่น macrocarrier ให้อยู่กลางวงแหวน
6. topping screen ที่เป็นสแตนเลสมาใส่ใน microcarrier launch assembly
7. ดูด macrocarrier 9 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยพลาสติกที่มีชิ้นตามที่ต้องการถ่ายขึ้น ผสมกับอนุภาคทั้งสแตน หรือ ทองคำ ใส่ลงแผ่น macrocarrier โดยใช้ปลายไมโครปิเปตเกลี่ยไปมาให้กระจายทั่วบริเวณตรงกลาง รอจนแห้ง
8. นำ macrocarrier holder พลิกกลับด้าน มาวางบน microcarrier launch assembly
9. ประกอบส่วนประกอบต่าง ๆ พร้อมทั้งจะยิง โดยวางเนื้อเยื่อที่จะยิงเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร
10. ปรับความดันภายในเครื่องยิงปืนให้เป็นสูญญากาศปั๊มก๊าซฮีเลียมให้มีปริมาณ 80 พีเอสไอ (psi) และทำการยิง
11. หลังจากยิงอนุภาคจะเห็น microcarrier ถูกแรงดันไปติดอยู่บน stopping screen
12. ทำการตรวจสอบการย้ายชิ้นจากการแสดงออกของยีนกัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

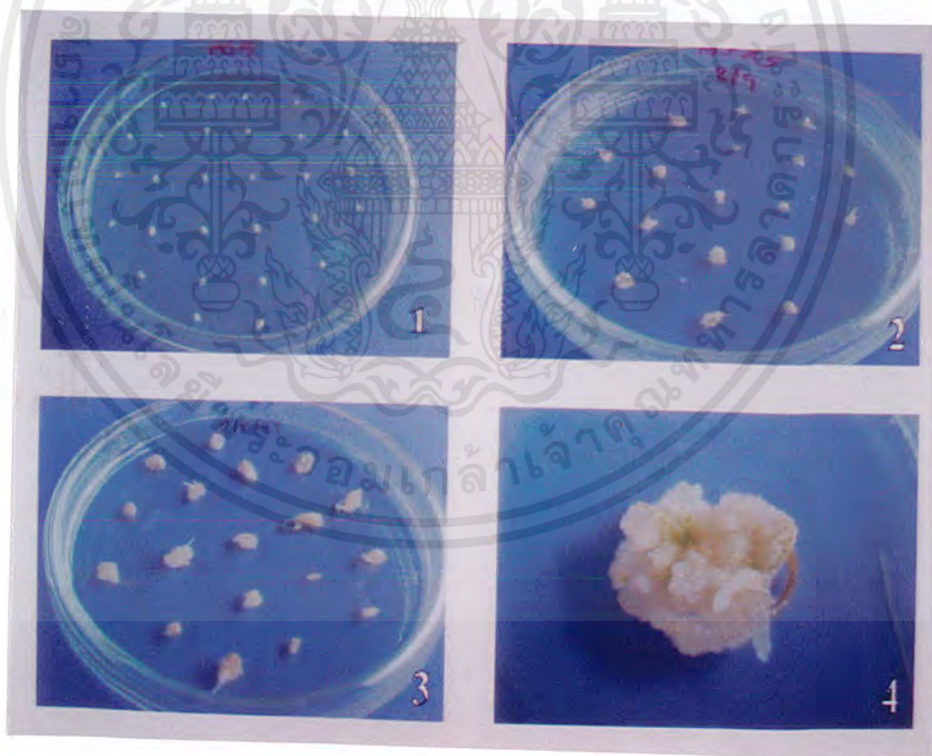
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพด

พันธุ์อินทรี 2

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ระดับ คือ 0.10 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) การเจริญของแคลลัสเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วันหลังจากตัดยอดและรากเดิมออกแล้วปรากฏว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ภาพแสดงลักษณะของการชักนำเอ็มบริโอให้เป็นแคลลัส

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. เอ็มบริโออายุ 1 วัน | 2. แคลลัสอายุ 5 วัน |
| 3. แคลลัสอายุ 7 วัน | 4. แคลลัสอายุ 14 วัน |

การทดลองที่ 2. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลสสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2

จากการชักนำแคลสสของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ให้เจริญเป็นต้นใหม่จะทำโดยการนำแคลสสที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่สามารถชักนำแคลสสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด โดยใช้อาหารสูตร N₆ และ MS ที่มีความเข้มข้นของสารประกอบในสูตรอาหารต่างกัน 8 ระดับ (ตารางที่ 5) ปรากฏว่าแคลสสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอตินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร สามารถเจริญเป็นต้นข้าวโพดที่มียอด ลำต้น และรากที่แข็งแรงสมบูรณ์ได้ แสดงดัง รูปที่ 4

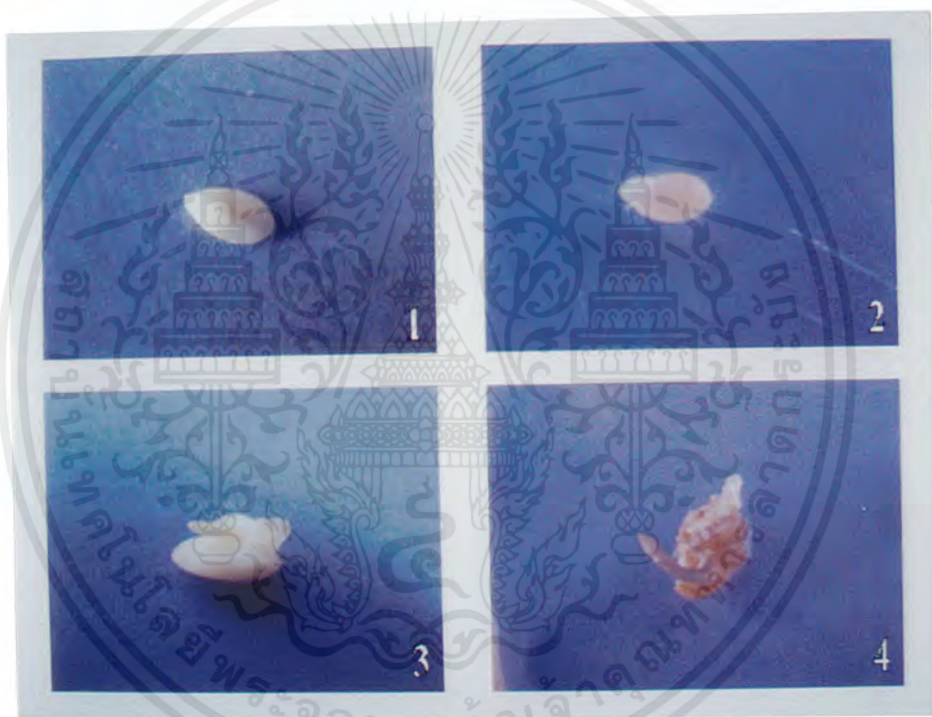


รูปที่ 4 ภาพแสดงลักษณะของการชักนำแคลสสให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

1. แคลสสที่ผ่านการชักนำที่อายุ 3 วัน
2. แคลสสที่ผ่านการชักนำที่อายุ 7 วัน
3. แคลสสที่ผ่านการชักนำที่อายุ 15 วัน
4. ต้นข้าวโพดที่ชักนำได้ต้นที่สมบูรณ์

การทดลองที่ 3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

จากการนำเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน มา และแคลลัสข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 6) เป็นเวลา 21 วัน ผลปรากฏว่าเอ็มบริโอและแคลลัสที่อยู่ในอาหารอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้น 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งแสดงว่าที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่ความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้เอ็มบริโอและแคลลัสข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ไม่สามารถเจริญได้ แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

1. เอ็มบริโออายุ 1 วัน
2. เอ็มบริโอที่ไม่สามารถต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี
3. แคลลัสอายุ 7 วัน
4. แคลลัสที่ไม่สามารถต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี

การทดลองที่ 4. การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดยใช้โกรแบคทีเรีย

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อของข้าวโพดโดยศึกษาถึง อายุของเอ็มบริโอ ความเข้มข้นของสารละลายเชื้อโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และ สายพันธุ์ของเชื้อโกรแบคทีเรีย โดยนำแคลลัสที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน มาเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนประกอบของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA (จากการทดลองที่ 1) แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีน ไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัม และ อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้นสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาหาคเชื้อโกรแบคทีเรีย ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ OD 0.01 และ 0.1 แคลลัสละ 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีคเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้อโกรแบคทีเรียเจริญ หลังจากนั้นนำแคลลัสมาล้างฆ่าเชื้อโกรแบคทีเรียด้วยสารละลาย โซโฟแทกซินที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 2 ครั้ง ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS โดยใช้ GUS-buffer ตรวจสอบผลของการถ่ายยีนจะสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนแคลลัสแสดงดังรูปที่ 6 จากผลการทดลองพบว่า เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 มีอัตราการถ่ายยีนดีที่สุดที่ 80 เปอร์เซ็นต์ ในแคลลัสอายุ 5 วัน ที่ OD 0.01 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 มีอัตราการถ่ายยีนดีที่สุดที่ 90 เปอร์เซ็นต์ ในแคลลัสอายุ 5 วัน ที่ OD 0.01 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA 4404 มีอัตราการถ่ายยีนดีที่สุดที่ 80 เปอร์เซ็นต์ ในแคลลัสอายุ 3 วัน ที่ OD 0.01 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8-15

4.1. ผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ อโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิ่งโคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 1 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	40	6	4	0	0	0	10
	100	60	4	2	4	0	0	10
EHA 105	50	50	5	4	1	0	0	10
	100	80	2	0	3	5	0	10
LBA 4404	50	80	2	5	3	0	0	10
	100	90	1	4	4	1	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.2. ผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ อโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิ่งโคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 1 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	30	7	3	0	0	0	10
	100	60	4	3	2	1	0	10
EHA 105	50	70	3	0	1	6	0	10
	100	80	2	0	2	5	1	10
LBA 4404	50	40	6	1	3	0	0	10
	100	60	4	1	3	2	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. ผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 3 วัน ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 3 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ อโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิงโคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 3 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	30	7	3	0	0	0	10
	100	40	6	2	2	0	0	10
EHA 105	50	50	5	3	2	0	0	10
	100	30	7	3	0	0	0	10
LBA 4404	50	60	4	1	5	0	0	10
	100	80	2	1	5	2	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4. ผลการย้ายยีนด้วยโอโรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 3 วัน ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการย้ายยีนด้วยโอโรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 3 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ โอโรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิงโคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 3 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	50	5	4	1	0	0	10
	100	40	6	4	0	0	0	10
EHA 105	50	50	5	2	3	0	0	10
	100	30	7	3	0	0	0	10
LBA 4404	50	40	6	2	2	0	0	10
	100	70	3	3	2	2	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.5. ผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 5 วัน ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 5 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ อโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 5 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	80	2	1	3	4	0	10
	100	50	5	1	4	0	0	10
EHA 105	50	90	1	0	0	0	9	10
	100	80	2	0	3	2	3	10
LBA 4404	50	70	3	4	1	2	0	10
	100	50	5	3	1	1	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6. ผลการย้ายยีนด้วยโอโรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 5 วัน ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการย้ายยีนด้วยโอโรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 5 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ โอโรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิงโคน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 5 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	70	3	1	4	2	0	10
	100	50	5	3	2	0	0	10
EHA 105	50	80	2	0	0	1	7	10
	100	80	2	0	1	4	3	10
LBA 4404	50	30	7	3	0	0	0	10
	100	60	4	2	2	2	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.7. ผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.01 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ อโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 7 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	10	9	1	0	0	0	10
	100	30	7	2	1	0	0	10
EHA 105	50	30	7	2	1	0	0	10
	100	40	6	1	3	0	0	10
LBA 4404	50	40	6	3	1	0	0	10
	100	50	5	4	1	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

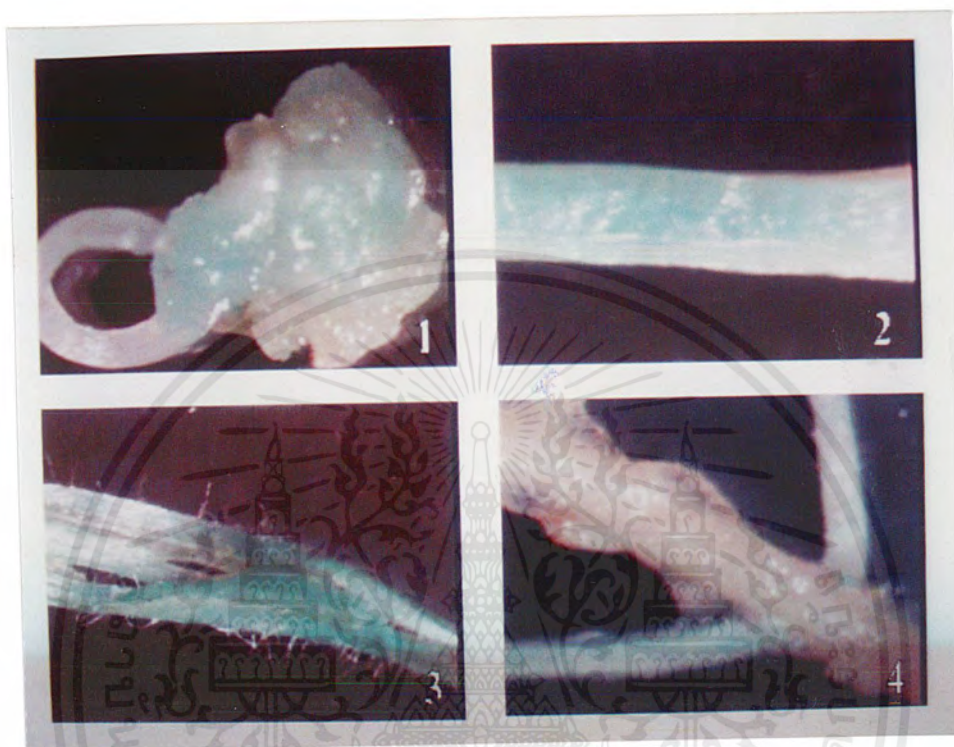
4.8. ผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงผลการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA 4404 ที่ OD 0.1 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน

สายพันธุ์ของเชื้อ อโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ อะซิโตไซลิง โกลน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้าย ยีน	ผลการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอ อายุ 7 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
AGL-1	50	60	4	2	3	1	0	10
	100	50	5	3	2	0	0	10
EHA 105	50	80	2	3	2	1	2	10
	100	70	3	3	2	1	1	10
LBA 4404	50	30	7	3	0	0	0	10
	100	50	5	3	2	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

- 0 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ
- 2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 1
- 3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดเจนกว่าระดับที่ 2
- 4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า



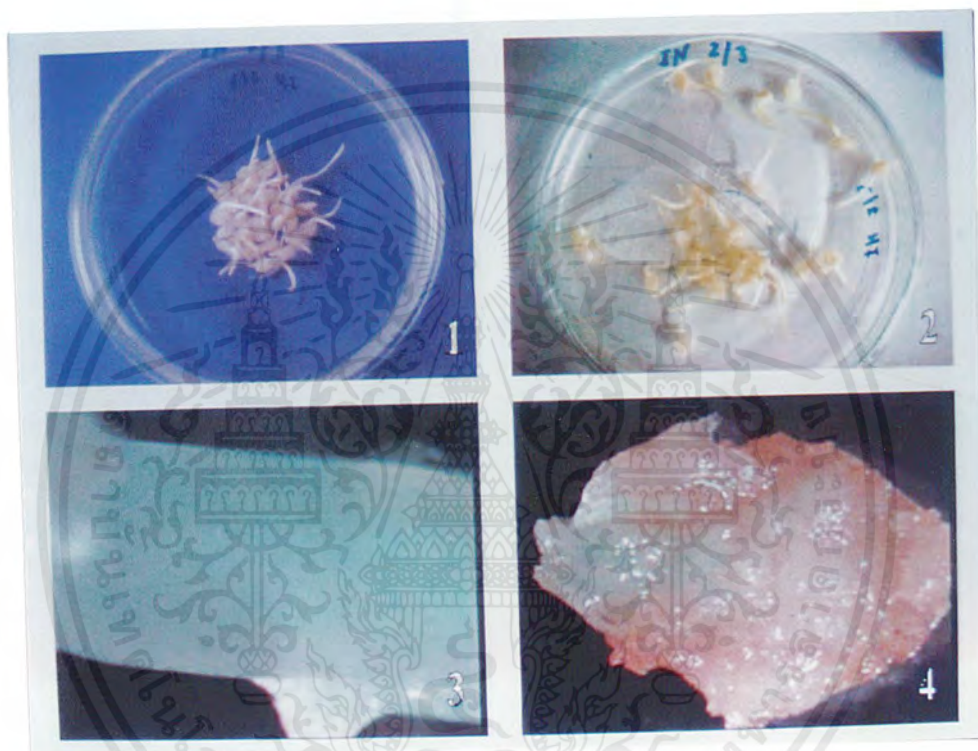
รูปที่ 6 ภาพแสดงผลการย้ายชิ้นด้วยอโกรแบบคทีเรียม

1. การย้ายชิ้นในแคลลัส
2. การย้ายชิ้นในลำต้น
3. การย้ายชิ้นในใบ
4. การย้ายชิ้นในราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 5. การศึกษาการย้ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีน (Particle gun bombardment)

จากการศึกษาการย้ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีน พบว่าสามารถย้ายยีนเข้าสู่เซลล์ของข้าวโพด ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี GUS Assays จะสังเกตการย้ายยีนได้จากการเกิดสีน้ำเงินขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อที่ทำการย้ายยีนเข้าไปแสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ภาพแสดงผลการย้ายยีนด้วยเครื่องยิงยีน

1. ลักษณะการเรียงเซลล์ก่อนทำการยิง
2. ลักษณะเซลล์หลังการยิง
3. ลำต้นที่ได้จากการย้ายยีนโดยเครื่องยิงยีน
4. ผลจากการยิงยีนในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

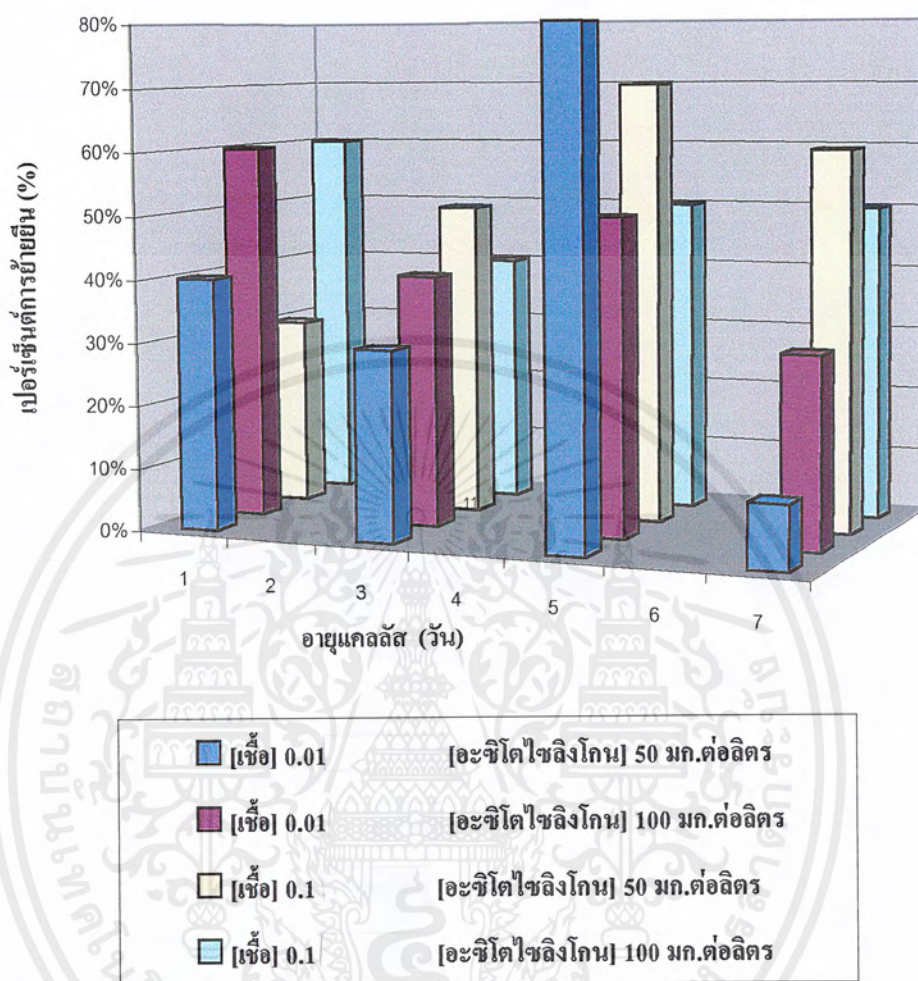
การทดลองที่ 1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2

จากผลการทดลองที่ 1 การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ระดับ คือ 0.10 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) การเจริญของแคลลัสเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน ปรากฏว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ความเข้มข้นทั้ง 7 ระดับ สามารถชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้แต่

จากการการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด

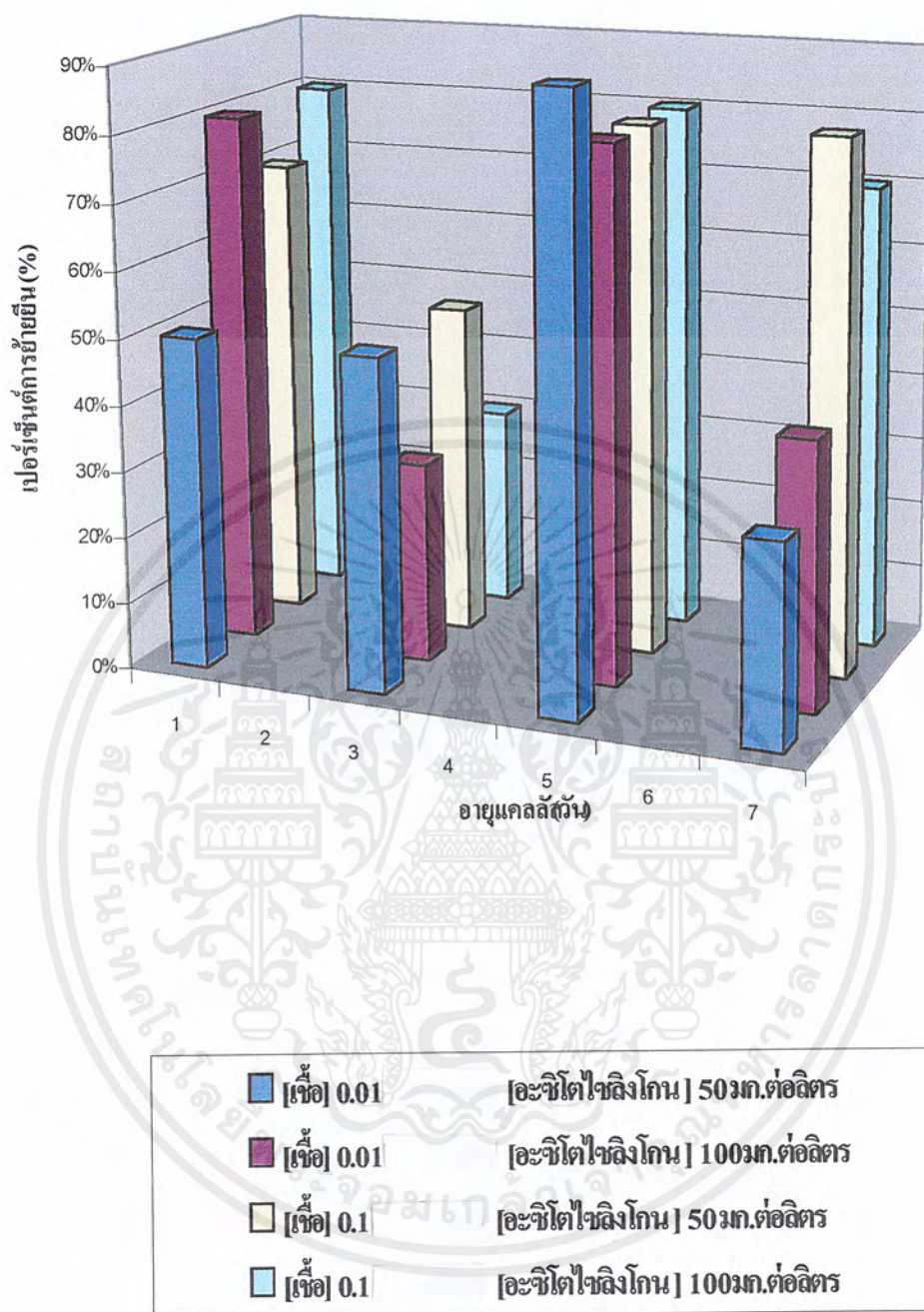
การทดลองที่ 2. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2

จากการชักนำแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ให้เจริญเป็นต้นใหม่จะทำได้โดยการนำแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด โดยใช้อาหารสูตร N_6 และ MS ที่มีความเข้มข้นของสารประกอบในสูตรอาหารต่างกัน 8 ระดับ (ตารางที่ 5) ปรากฏว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอดินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไฟตาเซต 2.6 กรัมต่อลิตร สามารถเจริญเป็นต้นข้าวโพดที่มียอด ลำต้น และรากที่แข็งแรงสมบูรณ์ได้ดีที่สุด



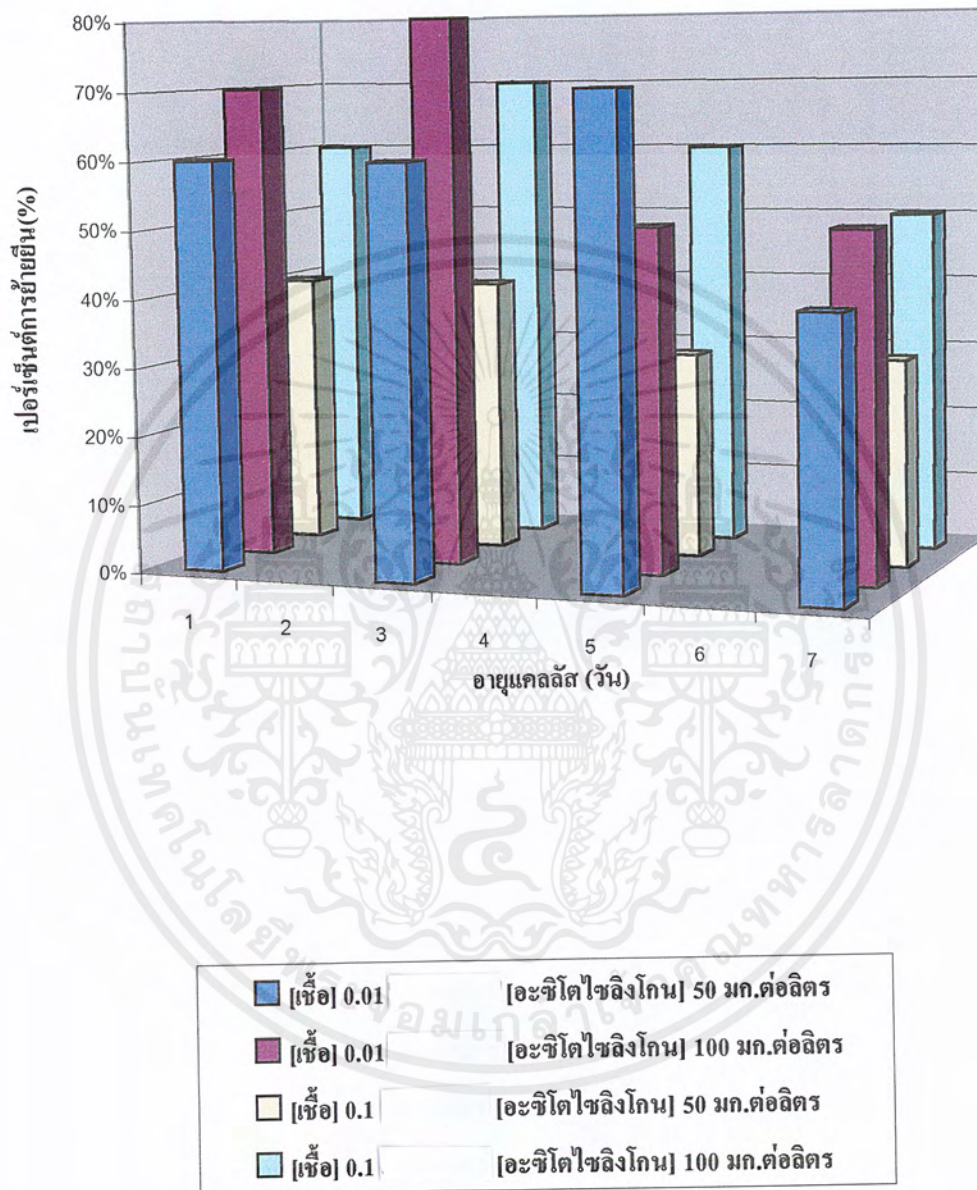
รูปที่ 8 กราฟแสดงผลการยืดขึ้นในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ของสายพันธุ์ AGL-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการย้ายยีนในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ของสายพันธุ์ EHA105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการย้ายถิ่นในข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ของสายพันธุ์ LBA 4404

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

จากการนำเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 1 วัน มา และแคลลัสข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 อายุ 7 วัน มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 6) ผลปรากฏว่าเอ็มบริโอและแคลลัสที่อยู่ในอาหารอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้น 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งแสดงว่าที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่ความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้เอ็มบริโอและแคลลัสข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ไม่สามารถเจริญได้

การทดลองที่ 4. การหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดยใช้โกรแบคทีเรีย

ผลจากการย้ายยีนในแคลลัสที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน มาเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA (จากการทดลองที่ 1) แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัม และอะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้นสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาหยดเชื้อโกรแบคทีเรีย ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสละ 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 3 วัน แล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS โดยใช้ GUS-buffer ตรวจสอบผลของการย้ายยีนจะสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนแคลลัสแสดงว่ามีการย้ายยีนเข้าไปในส่วนของเนื้อเยื่อได้ ซึ่งผลการทดลองสรุปจากรูปที่ 8-10 ได้ดังนี้

เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุดที่ 80 เปอร์เซ็นต์ในแคลลัสอายุ 5 วัน ที่ OD 0.01 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุดที่ 90 เปอร์เซ็นต์ในแคลลัสอายุ 5 วัน ที่ OD 0.01 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA 4404 มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุดที่ 80 เปอร์เซ็นต์ในแคลลัสอายุ 3 วัน ที่ OD 0.01 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 5. การศึกษาการย้ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีน (Particle gun bombardment)

ผลจากการย้ายยีนในแคลลัสของข้าวโพดด้วยเครื่องยิงยีน พบว่าสามารถทำการย้ายยีนได้โดยใช้ GUS-buffer ตรวจสอบผลของการย้ายยีน จะสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนแคลลัส

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 วิธีทดสอบก๊สแอสเส (GUS Assay)

เป็นวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนก๊สในแคลัสของข้าวโพด ทำโดยนำแคลัสของข้าวโพดที่ทำการย้ายยีนแล้วมาแช่ในสารละลายก๊ส
สารละลายก๊สประกอบด้วย

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

1. การเตรียมสารละลายก๊สมีขั้นตอนดังต่อไปนี้
 - 1.1. Solution A (0.2M NaPO₄)
 - 1.2. Solution B (0.1 M K₃Fe(CN)₆)
 - 1.3. Solution C (0.1 M K₄Fe(CN)₆ .3H₂O)
 - 1.4. Solution D (0.1 % Triton X-100)
2. ละลาย X-Glue 13 มิลลิกรัม (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) ใน 0.25 มิลลิกรัม DMSO (dimetyl sulfoxide)
3. นำ Solution A B C และ D จำนวน 5 0.25 0.25 และ 0.003 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมลงในหลอดพร้อมกับน้ำสะอาดอีก 4.5 มิลลิลิตร
4. เขย่าส่วนผสมนี้ให้ดีซึ่งจะได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยการกรอง (filter sterillization)
5. นำสารละลายมาใส่ในเอ็มบริโอเจนทว่ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
6. คูดสารละลายทิ้งแล้วแช่ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ให้ทว่ม แล้วนำไปตรวจการแสดงออกของยีนก๊ส จะมองเห็นสีน้ำเงิน

ตารางภาคผนวกที่ 2 สารเคมีในอาหารสูตร N₆ (Chu Medium) 1966

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
I	(NH ₄) ₂ SO ₄	463
	KNO ₃	2830
	KH ₂ PO ₄	400
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
II	CaCl ₂ ·2H ₂ O	166
III	MnSO ₄ ·H ₂ O	3.33
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.50
	H ₃ BO ₃	1.60
	KI	0.8
IV	Na ₂ EDTA	37.30
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80
V	Glycine	2.0
	Thiamine-HCl	1.00
	Pyridocxine-HCl	0.50
	Nicotinic acid	0.50
	L-proline	0.69 g/l
	Casein hydrolysate	0.10 g/l
	Sucrose	20 g/l
	Phytigel	2.6 g/l
	pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 สารเคมีในอาหารสูตร MS (Murashige and Shoog) 1962

	สารเคมี	ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น(เท่า)
I	NH_4NO_3	165	100
	KNO_3	190	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	
	KH_2PO_4	17	
II	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44	100
III	H_3BO_3	3.1	1000
	KI	0.415	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.125	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0125	
IV	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.33	100
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	
V	Na_2EDTA	3.73	100
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	
VI	Inositol	5	100
	Nicotinic acid	0.025	
	Pyridoxine-HCl	0.025	
	Thiamine-HCl	0.005	
	Glycine	0.1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร , ข้าวโพด. เอกสารทางวิชาการเล่มที่ 4. กรุงเทพฯ.2535. 291 น.
- กอบเกียรติ แสงนิล. 2532. การเพาะเลี้ยงคัพพะข้าวโพดเพิ่มระดับความทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ ฯ.
- นิตยศรี แสงเดือน อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม ประศาสตร์ เกื้อมณี และ ชำนาญ นัตรแก้ว. 2536. การชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. ฉบับที่ 26 (4-6) 67-79 น.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล.2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพฯ.
- อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม และนิตยศรี แสงเดือน. 2535. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ ข้าวโพดลูกผสม SW3 x INV. ในรายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 749-754 น.
- อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม และนิตยศรี แสงเดือน. 2541. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ ข้าวโพดลูกผสม SW₃ ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่24. 608-609 น.
- Armstrong, C.L and C.G. Green 1985. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214.
- Brigitte Krautwig and Horst Lorz. 1995. Single androgenetic structures of maize (*Zea mays* L.) for the initiation of homogenous cell suspension and protoplast cultures. *Plant Cell Reports*. 14. 477-481.
- Chourey, P.S. and D.B. Zurawski. 1981. Callus formation from protoplasts of a maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.* 59: 341-344.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C. S., Hus, C., Yin K.C., and C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18 : 695-668.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- David, A.S., and V.L. Chandler. 1999. A mutation in the *pale aleurone color1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. *Plant Cell Reports*. 11. 5-14.
- Duncan, D.R., M.E. William, M.E. Zehr and J.M. Widholm. 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165: 32
- Duncan, D.R and J.M Widholm . 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiol*. 83: 705-708.
- Green, C.E and R.L Phillips. 1975. Plant regenerate from tissue culture of maize. *Crop Sci*. 15: 417-421.
- Halluin, K. D., E. Bonne, M. Bossut, M. D. Beuckeleer, and J Leemans. 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation . *The Plant Cell*. 4 : 1495-1505.
- Imbrie-Milligan, C.W., K.K Kamo and T.K. Hodges. 1987. Microcallus growth from maize protoplasts. *Planta* 171 : 58-64.
- Imbrie-Milligan, C.W. and T.K. Hodges. 1986. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168 : 395-401.
- Jaime, M.H., M.Lopez , and R.J. Ordas. 1999. Transient expression of the *uid A* gene in *Pinus pinea* cotyledons: A study of heterologous promoter sequences. *Plant Cell , Tissue and Organ Culture*. 56 :69-78.
- Jardinaud, M.F, A Souvre, M. Beckert and G. Alibert. 1995. Optimization of DNA transfer and transient β -glucuronidase expression in electroporated maize (*Zea mays L.*) microspores. *Plant Cell Reports*. 15: 55-58.
- Jeanette, L. R., J R. Kikkert, M K. Roy and J. C. Sanfort. 1994 . Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. *Plant Cell Reports*. 13 : 212-217.
- Kamo, K.K., K.L. Chang, M.E. Lynn and T.K. Hodges. 1987. Embryogenic callus formation from maize protoplasts. *Planta* 172 : 245-251.
- Kathleen D'Halluin, E Bonne, M Bossut, M.D. Beuckeleer, and Jan Leemans. (1992). Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. *The Plant Cell*, 4 :1495-1505.

- Marie-Francoise J, A Souvire, M. Beckert, and Gilbert Alibert. (1995). Optimisation of DNA transfer and transient β -glucuronidase expression in electroporated maize (*Zea mays L.*) microspores. *Plant Cell Reports*, 15 : 55-58.
- Pareddy, D.R., R.I. Greyson and D.C. Walden. 1987. Fertilization and seed production with pollen from in-vitro cultured maize tassel. *Planta*. 170: 141-143.
- Parker. W.B., D.A. Somers, D.L. Wyse, R.A. Keith, J.B. Burton, J.W. Gronwald and B.G. Gengenbach. 1990. Selection and characterization of sethoxydim-tolerant maize tissue culture. *Plant Physiol.* 92 : 1220-1225.
- Potrykus, I., C.T. Harms, H. Lorz and E. Thomas. 1977. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays L.*). *Mol. Gen. Genet.* 156 : 347-350.
- Rhodes, C.A., K.S. Lowe and K.L. Ruby. 1988. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell culture. *Bio/Technology* 7 : 581-587.
- Tibor, P., L.Ye, Y.Chang, A. Mitra, L.Lin, F.M. Davis, W.P. Williams, and D.S. Luthe. 2000. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and lepidoptera. *Plant Cell Reports*. 12. 1031-1040.
- Saleem, M. And A.J. Cutler. 1987. Stabilizing corn leaf protoplast with n-propyl gallate. *J. Plant. Physiol.* 128: 479-484.
- Shillito, R.D., G.K. Carswell, C.M. Johnson, J.J. DiMaio and C.T. Harms. 1989. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Bio/Technology* 7 : 581-587.
- Sukhapinda K., M.E. Kozuch, B. Rubin-Wilson, W.M. Ainley, and D.J. Merlo. 1993. Transformation of maize (*Zea mays L.*) protoplasts and regeneration of haploid transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 13 : 63-68.
- Sun, C.S., L.M. Prioli and M.R. Sondahl. 1989. Regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of super sweet (sh2 sh2) corn. *Plant cell Reports* 8 : 313-316.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. .1987. Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays L.*). *Theor. Appl. Genet.* 73: 793-78.
- Welter M.E., D.S. Clayton, M.A. Miller, and J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. *Plant Cell Reports*. 14 : 725-729.

- Wesley, B., O. Folkerts, C. Garnaat, O. Crasta, B. Roth, and B. Bowen. 2000. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *Plant Cell Reports*. 12 :65-79.
- Yuji, I., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

