สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

นางสาวกัลยาณี มีเพียร

นางสาวจริยา เบญจานุกรม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35869
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gene transformation in suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*

Miss Kulyanee Meepian

Miss Jariya Benjanukrom

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Reguirement for the Degree of Bachelor of Science

Department oı Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง การย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

โดย นางสาวกัลยาณี มีเพียร รหัสประจำตัว 39054303
นางสาวจริยา เบญจานุกรม รหัสประจำตัว 39054306
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....
(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานคณะกรรมการ

.....
(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

.....
(อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*
นักศึกษา	นางสาวกัลยาณี มีเพียร 39054303
	นางสาวจริยา เบญจานุกรม 39054306
อาจารย์ที่ปรึกษา	อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

ผลของฮอร์โมน NAA ในการชักนำเอ็มบริโอแก่ของข้าวพันธุ์ กข 6 ขาวดอกมะลิ ชัยนาท และสุพรรณบุรี 60 ให้กลายเป็นแคลลัส พบว่าสูตรอาหารที่ เหมาะสม คือ อาหารแข็งสูตร NB ที่มี NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าอาหารแข็งสูตร NB ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลของไฟทาเจล และซีเอติน ในการชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้นใหม่ พบว่าในข้าวทั้ง 4 พันธุ์จะมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดต้นใหม่บนอาหารแข็งสูตร NB ที่มี BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี พบว่าข้าวพันธุ์ กข 6 มีความสามารถสูงสุดในการต้านทานได้ที่ระดับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวพันธุ์ชัยนาท และสุพรรณบุรี 60 มีความสามารถสูงสุดในการต้านทานได้ที่ระดับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิมีความสามารถสูงสุดในการต้านทานได้ที่ระดับ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

การย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์โดย ใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์เป็นพาหะ พบว่าผลของการย้ายยีนจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของข้าว และสายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม โดยเชื้อสายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุดในข้าวพันธุ์ กข 6 รองมาคือ AGL-1 ส่วน LBA 4404 ไม่ปรากฏผลการย้ายยีน ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่า AGL-1 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุด รองมา คือ EHA 105 และไม่ปรากฏผลการย้ายยีนใน LBA 4404 ข้าวพันธุ์ชัยนาทนั้น EHA 105 จะให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการย้ายยีน รองมาคือ LBA 4404 และไม่ปรากฏผลการย้ายยีนใน AGL-1 ส่วนข้าวสุพรรณบุรี 60 พบว่า EHA 105 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุด รองมาคือ LBA 4404 และ AGL-1 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : Gene transformation in suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*

Name : Miss Kalyanee Meepien 39054303

Miss Jariya Benjanukrom 39054306

Special Project Advisor : Anurug Poeiam

Academic : 1999

Abstract

The result of hormone for induced rice (*Oryza sativa* L.) embryo, Khao Dawk Mali, Chainat and SP 60. For all breed, NB medium with NAA 1.5 mg/l have more efficient for induced callus than NB medium with 0.5 mg/l.

The result of phytagel and zeatin to regenerate form cell suspension. For all breed have higher percent of regenerate on NB medium with BAP 3 mg/l, NAA 0.25 mg/l, phytagel 5.2 g/l and zeatin 1.0 mg/l. For hygromycin B resistant, RD 6 have higher hygromycin B resistant at 20 mg/l . Chainat and SP 60 can resistant hygromycin B at 30 mg/l. And Khao Dawk Mali can resistant hygromycin B at 60 mg/l.

Transformation of rice suspension culture using *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1, EHA105 and LBA4404 mediated gene transfer. The efficient of gene transformation varies according to each breed of rice and each strain of *A.tumefaciens* . For RD 6, the most efficient strain is EHA and AGL-1 respectively. Using LBA, can not found the expression of gene transfer. For Khao Dawk Mali, the most efficient strain is AGL-1 and EHA respectively. Using LBA, can not found the expression of gene transfer. For Chainat, the most efficient strain is EHA and AGL-1 respectively. Using LBA, can not found the expression of gene transfer. In the case of SP 60, the most efficient strain is EHA, LBA and AGL-1 respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการ อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการ และอาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย และตรวจแก้โครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่กรุณาสละเวลาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
- ที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง	23
1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส	23
2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในอาหารที่ชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดต้นใหม่ในข้าว 4 พันธุ์	24
3. ความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ในเซลล์แขวนลอย	45
4. การย้ายยีน	48
4.1 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefeciens* สายพันธุ์AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	48
4.2 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefeciens* สายพันธุ์AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	50
4.3 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefeciens* สายพันธุ์AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อง	หน้า
4.4 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefeciens* สายพันธุ์AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	54
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	58
1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส	58
2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในอาหารที่ชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดต้นใหม่ในข้าว 4 พันธุ์	58
3. ความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ในเซลล์แขวนลอย	59
4. การย้ายยีน	60
ภาคผนวก	61
เอกสารอ้างอิง	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช	14
2	แสดงตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช	14
3	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารสูตรที่ 1	24
4	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารสูตรที่ 2	24
5	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารสูตรที่ 3	26
6	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารสูตรที่ 4	26
7	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตรที่ 1	29
8	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตรที่ 2	29
9	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตรที่ 3	31
10	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตรที่ 4	31
11	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 1	34
12	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 2	34
13	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 3	36
14	แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 4	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ หน้า

15 แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 1 39
16 แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 2 39
17 แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 3 41
18 แสดงเปอร์เซ็นต์แสดงการชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 4 41
19 แสดงผลของการทดสอบความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์ 46
20 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 48
21 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 50
22 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 52
23 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท 54
ภาคผนวกตารางที่ 1 61
ภาคผนวกตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารแข็งสูตร NB 62
ภาคผนวกตารางที่ 3 สารเคมีในอาหารสูตร N_6 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ภาพแบบจำลองการยึดเกาะของ *A.tumefaciens*	15
2	แสดงการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส	23
3	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในอาหารแข็ง NB สูตร 1 และสูตร 2	25
4	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในอาหารแข็ง NB สูตร 3 และสูตร 4	27
5	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณซีเอตินและไฟทาเจล ที่เป็นส่วนผสมในอาหารแข็งสูตร NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ	28
6	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60ในอาหารแข็ง NB สูตร 1 และสูตร 2	30
7	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60ในอาหารแข็ง NB สูตร 3 และสูตร 4	32
8	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณซีเอตินและไฟทาเจล ที่เป็นส่วนผสมในอาหารแข็งสูตร NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60	33
9	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข 6ในอาหารแข็ง NB สูตร 1 และสูตร 2	35
10	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข 6ในอาหารแข็ง NB สูตร 3 และสูตร 4	37
11	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณซีเอตินและไฟทาเจล ที่เป็นส่วนผสมในอาหารแข็งสูตร NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ในข้าวพันธุ์ กข 6	38
12	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ชัยนาทในอาหารแข็ง NB สูตร 1 และสูตร 2	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่		หน้า
13	แสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ชัยนาทในอาหารแข็ง NB สูตร 3 และสูตร 4	42
14	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณซีเอติน และไฟทาเจล ที่เป็นส่วนผสมในอาหารแข็งสูตร NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ในข้าวพันธุ์ชัยนาท	43
15	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นใหม่โดยใช้อาหารแข็ง NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร	44
16	แสดงการชักนำให้เกิดต้นใหม่	45
17	แสดงผลการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของเซลล์แขวนลอยในข้าว 4 พันธุ์	46
18	แสดงการเปรียบเทียบระหว่างลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงบนอาหาร ที่มีไฮโกรมัยซิน บี 0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน บี ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้เซลล์แขวนลอยของข้าวหยุดการเจริญ	47
19	แสดงผลการย้ายยีนด้วย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	49
20	แสดงผลการย้ายยีนด้วย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	51
21	แสดงผลการย้ายยีนด้วย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	53
22	แสดงผลการย้ายยีนด้วย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และLBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	55
23	แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และLBA4404 ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ขาวดอกมะลิ กข 6 และชัยนาท ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	56
24	แสดงการย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าว	57
24	ภาคผนวกรูปที่ 1 ก. พลาสมิด pCAMBIA 1301	
	ข. เชื้ออโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็ง	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันทั่วโลกผลิตข้าว ได้เฉลี่ยปีละประมาณ 530 ล้านตัน ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ทั้งหมด ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าการส่งออกในตลาดโลกสูง และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ผลผลิตข้าวประมาณร้อยละ 60 ของประเทศ ใช้ในการบริโภคในประเทศทั้งในรูปการบริโภคโดยตรง การใช้ทำพันธุ์ และกิจการอื่นๆ ทำให้ข้าวมีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทย ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำความรู้ทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อให้ได้ข้าวที่มีผลผลิตต่อไร่สูง ต้านทานโรค และแมลงได้ดี โดยใช้วิธีการย้ายยีนในการสร้างข้าวสายพันธุ์ใหม่หรือข้าวจำลองพันธุ์ (Transgenic Rice) มีรายงานว่าการย้ายยีนในข้าวมีได้ หลายวิธี ได้แก่ การย้ายยีนโดยใช้สารเคมี polethylene glycol (PEG) หรือการใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการย้ายยีนให้โพรโทพลาสต์โดยเครื่อง electroporation และการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะรวมไปถึงกรรมวิธีการย้ายยีนโดย Paritcle Bombardment (Takashi Hagio., 1998) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด และยีนที่ย้ายโอนจะแสดงผลได้ในเวลาไม่กี่วัน แต่ประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ของยีนต่ำ มีการกลายพันธุ์สูง และไม่คุ้มค่าทางการค้า จึงหันมาใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนำยีนเข้าสู่ข้าว ตามรายงานที่พบว่าประสบความสำเร็จในข้าวสายพันธุ์จาปอนิคา (Raineri และคณะ.,1990) และสายพันธุ์ข้าวอินดิคา (Chan และคณะ.,1992) และมีการศึกษาการชักนำต้นอ่อนจากแคลลัส ซึ่งให้ผลตอบสนองต่อการย้ายยีนผ่านอโกรแบคทีเรียมได้ดี (Hiei และคณะ., 1997)

สำหรับประเทศเกษตรกรรมกำลังพัฒนาอย่างประเทศไทยนั้น มีการศึกษารายงานการทดลองพบว่าการใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ด้วยเหตุนี้การศึกษาสภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสมต่อการใช้อโกรแบคทีเรียมเพื่อย้ายยีนในข้าวจึงมีความสำคัญ และเป็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส
2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดต้นใหม่
3. ศึกษาความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ในเซลล์แขวนลอยของข้าว
4. ศึกษาการย้ายยีนและแสดงออกของยีนหลังจากการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แขวนลอยของข้าว

ขอบเขตของการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ของข้าวให้กลายเป็นแคลลัส ชักนำแคลลัสให้กลายเป็นเซลล์แขวนลอย ชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้น ศึกษาความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ในเซลล์แขวนลอย จากนั้นจึงย้ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนเครื่องหมายภายหลังจากการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. งานวิจัยนี้มีส่วนช่วยสนับสนุนการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช เพื่อสานต่องานทางด้านพันธุวิศวกรรมให้ครบวงจร สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพของพืช
2. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จะเป็นแหล่งข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการย้ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

หนึ่งในบรรดาพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าการส่งออกสูงสุดของประเทศคือ ข้าว(*Oryza sativa* L.) นอกจากการผลิตเพื่อการค้าต่างประเทศแล้ว ร้อยละ 60 ของการผลิตได้ถูกใช้ไปเพื่อการบริโภคภายในประเทศ การใช้ทำพันธุ์ และกิจการอื่นๆ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร,2542) ข้าวไทยจัดเป็นข้าวคุณภาพสูงเป็นที่ต้องการของตลาดโลก จวบจนปัจจุบันประชากรโลกเพิ่มขึ้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ ข้าวพันธุ์ดี คือ มีผลผลิตต่อไร่สูง ต้านทานโรค และแมลงได้ดี ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อไปอย่างต่อเนื่อง

ข้าวทั่วโลกมีถึง 120,000 พันธุ์ ในประเทศไทยมีประมาณ 3,500 พันธุ์ จัดเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง (วันชัย,2541) ข้าวเป็นพืชผสมตัวเองตามธรรมชาติ มีสภาพลักษณะทางพันธุกรรมของพืชแต่ละต้นอยู่ในสภาพคงตัว (homozygosity) จึงมีความแปรผันทางพันธุกรรมตามธรรมชาติค่อนข้างช้า ในการเลือกพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์นั้น ควรเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งมีความแปรผันภายในประชากรพอสมควร

ประพาส (2531) และ อรรควุฒิ (2536) รายงานว่า ข้าวเป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในตระกูลหญ้า (Gramineae Family) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจแบ่งข้าวได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1. *Oryza sativa* ปลูกกันโดยทั่วไป
2. *Oryza glaberrima* ปลูกในแอฟริกาเท่านั้น
3. ข้าวป่าที่เกิดตามธรรมชาติ

นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังจำแนก *Oryza sativa* ได้เป็น 3 กลุ่ม โดยยึดลักษณะภายนอกของลำต้น เมล็ด และเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวทั้ง 3 ชนิดมาใช้เป็นเกณฑ์

ข้าวอินดิคา (Indica rice) เมล็ดเรียวยาว ต้นสูงและอ่อน ใบกว้างสีเขียวอ่อน แตกกอมาก ผลผลิตต่อไร่ต่ำ มีการตอบสนองต่อปุ๋ยน้อย แต่ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ง่ายปลูกในเขตมรสุม เช่น เวียดนาม อินเดีย ฟิลิปปินส์และไทย

ข้าวจาปอนิคา (Japonica rice) เมล็ดป้อมสั้น ต้นเตี้ยแข็ง ใบแคบเขียวแก่ แตกกอปานกลาง ให้ผลผลิตสูง มีการตอบสนองต่อปุ๋ยดีมาก ปลูกในพื้นที่เขตอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และสหรัฐอเมริกา

ข้าวจาวานิคา (Javanica rice) เมล็ดกว้างหนา ใบกว้างและแข็งสีเขียวอ่อน แตกกอน้อย ให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำพบในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวในกลุ่มอินดิคามีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่พบปัญหาในการผลิตคือมีผลผลิตต่ำ อันเนื่องมาจากการทำลายของโรค และแมลง จึงได้มีการพยายามปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยเริ่มครั้งแรกจากพระราชดำริของรัชกาลที่ 5 ให้เกษตรกรนำพันธุ์ข้าวพื้นเมืองมาประกวดที่อำเภอธัญบุรีในปี พ.ศ. 2450 พันธุ์ข้าวที่ส่งเข้าประกวดนั้นทางการได้นำมาปลูกและคัดเลือกพันธุ์ที่มีคุณภาพเมล็ดดีจนได้เป็นข้าวพันธุ์ดีแล้วจึงแจกจ่ายให้เกษตรกรเพื่อทำการปลูก จวบจนระหว่างปี พ.ศ. 2493-2495 ได้มีการรวบรวมพันธุ์ข้าวทั่วประเทศอย่างจริงจัง โดยกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หนึ่งในจำนวนพันธุ์ข้าวที่รวบรวมได้ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ ซึ่งภายหลังได้ประกาศเป็นพันธุ์ข้าวรับรองในปี พ.ศ. 2502 ในชื่อ ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีลักษณะพิเศษคือ มีสีขาวเหมือนดอกมะลิและมีกลิ่นหอมเหมือนใบเตย

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองในไทยจะมีเมล็ดยาวเรียว ใส ซึ่งในอดีตไม่พบว่ามีปัญหาเรื่องการระบาดของโรค และแมลง จวบจนเริ่มมีการผลิตเพื่อการค้าซึ่งมีการปลูกเป็นพื้นที่มากอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคระบาด และแมลงเข้าทำลายอย่างรุนแรง จึงมีการปรับปรุงพัฒนาข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีต้นเตี้ยให้ผลผลิตสูงในชื่อข้าว กข ชนิดต่างๆ ในปี พ.ศ. 2521-2523 ได้ผลิตข้าว กข 23 ต้านทานโรคเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และข้าว กข 6 ซึ่งเป็นข้าวเหนียวที่เกษตรกรนิยมปลูก พันธุ์ข้าวที่พัฒนาใหม่จะใช้ชื่อตามสถานีวิจัยที่เป็นผู้พัฒนา เช่น ข้าวสุพรรณบุรี และข้าวชัยนาทที่ทนต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในปี พ.ศ. 2530 พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวมีพระชนมายุครบ 60 พรรษา ทางการได้ออกข้าวสุพรรณบุรี 60 ซึ่งต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และมีผลผลิตต่อไร่สูง

จะเห็นได้ว่ามีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอย่างต่อเนื่อง เพราะนอกจากการเกิดโรคระบาด และแมลงเข้าทำลายแล้วยังจำเป็นต้องคัดหาพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในแต่ละภูมิภาค จึงทำให้มีการใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ วิธีที่น่าสนใจวิธีหนึ่ง คือ การใช้อโกรแบคทีเรียม ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นตัวกลางนำยีนเข้าสู่เซลล์ ข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก เมื่อเทียบกับการใช้เครื่องยิงอนุภาค สามารถทราบขอบเขตแน่นอนของชิ้น DNAที่จะย้าย และไม่จำเป็นต้องย้ายผ่านโพรโทพลาสต์ ข้อเสีย คือ ประสิทธิภาพในการย้ายยีนในข้าวอินดิคาต่ำมากเมื่อเทียบกับข้าวจาปอนิคาหรือพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่นๆ

งานทดลองนี้จึงเป็นการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายยีนในข้าวโดยใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะแล้วนำผลที่ได้ไปใช้ในการพัฒนา และปรับปรุง เพื่อใช้ในการย้ายยีนที่มีประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ประสบผลสำเร็จนั้นประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ กล่าวโดยสรุปได้ดังนี้ (ไพบูลย์,2524)

1. ปัจจัยภายในของพืช

1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (endogenous factor) คือการเจริญเป็นยอดหรือรากของเนื้อเยื่อ ซึ่งขึ้นกับชนิดพืช ซึ่งเป็นอิทธิพลจากพันธุกรรม

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตภายในพืช (hormones) สำหรับเซลล์พืชแล้วนั้น ฮอร์โมนบางชนิดจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อพัฒนาสู่อวัยวะต่าง ๆ ในขณะที่ฮอร์โมนบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกัน

2. ปัจจัยภายนอก

2.1 แสง(light) แสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้ในการชักนำให้เกิดการเจริญเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ มากกว่าใช้ในการสังเคราะห์แสง

2.1.1 คุณภาพของแสง (light quality) แสงสีแดงและแสงสีน้ำเงิน มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อหลายชนิด ส่วนแสงฟาร์เรดยับยั้งการเกิดยอด

2.1.2 ความเข้มข้นของแสง (light intensity) ความเข้มข้นของแสงในระดับต่าง ๆ จะส่งผลต่อการเจริญเติบ โต และการพัฒนาของเนื้อเยื่อ

2.1.3 ระยะเวลาในการให้แสง (light duration) ส่วนมากจะใช้ช่วงมืด 8 ชั่วโมง และให้แสง 16 ชั่วโมง จะให้ผลดีในการพัฒนาของเนื้อเยื่อ

2.2 อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมคือประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) Miller และ Skoog พบว่าการเกิดต้น ราก และแคลลัสของพืชแต่ละชนิดนั้น ขึ้นกับความสมดุลระหว่างปริมาณ ออกซินกับไซโตไคนินในอาหาร

3. ปัจจัยอื่น ๆ

3.1 ขนาดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

3.2 สภาวะของการเพาะเลี้ยง

3.3 องค์ประกอบของอาหาร

อรดี (2539) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไป คือการนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะปลอดจุลินทรีย์ และมีการควบคุมอุณหภูมิ แสง และความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จเพียงใดต้องขึ้นกับสูตรอาหาร ปัจจัยจากตัวพืช ปัจจัยภายนอกและความสมดุลระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 กลุ่ม คือ ออกซิน ไซโตไคนิน และ ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

1. ออกซิน (auxin)

เป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยไฮโดรเจน และออกซิเจน บางชนิดมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น Indol 3-acetic acid (IAA) α-napthalene acetic acid (NAA) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2,4,5 -trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) 3- idolebutyric acid (IBA) และ 4-amino-3,5,6- trichlorbenzeacetic acid แสดงผลต่อเนื้อเยื่อโดย

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ
2. เสริมการแบ่งตัวของเซลล์โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก
3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. ไซโตไคนิน(cytokinin)

เป็นอนุพันธ์ของ 6-amino-purine สารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 6-amino-purine ก็มีสมบัติเป็นไซโตไคนิน เช่น N^6-furferyladenine (kinetin) 6-benzyl-amino-purine (BA หรือ BAP) 2-isopentenyl aminopurine (2ip) และ 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino) purine (zeatin) มีผลช่วยในการแบ่งเซลล์ให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนีน โดยจะเกิดในบริเวณปลายรากและเอ็มบริโอที่กำลังพัฒนา มีผลต่อพืชดังนี้

1. ชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และชักนำให้ให้พืชที่เป็นปุ่มปมมีการแบ่งเซลล์

2. ช่วยให้มีการแตกหน่อ และให้มีการงอกของหน่อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และพืชที่เป็นโรคปุ่มปม

3. จิบเบอร์เรลลิก แอสิด (gibberellic acid) = GA_3 สูตรทางเคมี $C_{19}H_{22}O_6$ สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิกที่พบในเนื้อเยื่อหน่อที่กำลังงอก และเอ็มบริโอที่มีการพัฒนา กรดจิบเบอเรลลิกจะเคลื่อนที่ตามท่อน้ำ และท่ออาหาร ส่งผลต่อพืชดังนี้

1. ทำให้เกิดการขยายตัวของลำต้นที่มีความสูงมาก ๆ โดยจะกระตุ้นทั้งการแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์

2. ชักนำให้เกิดการงอกในเมล็ดที่ปกติต้องการความเย็น และแสงในการงอก

3. กระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์โดยเฉพาะ แอลฟาอะไมเลสซึ่งใช้ในพืชที่มีการงอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวได้พัฒนาอย่างรวดเร็ว เพราะสามารถใช้ชิ้นส่วนได้เกือบทั้งต้น ในการนำมาเพาะเลี้ยงเป็นแคลลัสเพื่อชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตามต้องการ เช่น ราก (Wu และLi , 1970) ลำต้น (Dun-Yi และKrikorian, 1981) อับละอองเกสร (อุดม และอรดี, 2523; สนธิชัย และคณะ, 2528) เอ็มบริโอ (Hartke และLorz, 1989;Boissot และคณะ, 1990; ประภา, 2532) เซลล์แขวนลอย Poeaim และ คณะ (1995) และ โพรโทพลาสต์ Poeaim และ คณะ (1996)

แอลโพรลีนเป็นกรดอะมิโนที่พบเฉพาะพืชที่มีสภาวะเครียดเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมของสภาพแวดล้อม เช่น การขาดน้ำ Chowdhry และคณะ (1993) ได้ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของแอลโพรลีน และแอลทริปโตเฟนที่มีต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนซิส และการชักนำให้เกิดต้นของข้าวพันธุ์อินดิคา Pusa 169 พบว่าทั้งแอลโพรลีน และแอลทริปโตเฟน ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแคลลัส แต่ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น และทำให้เกิดต้นในเปอร์เซ็นต์ที่สูงขึ้น แต่ยังไม่ทราบกลไกแน่นอนที่ส่งผลต่อเซลล์

Henke และคณะ (1978) ศึกษาการเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าวพันธุ์ C.I. 8970-S ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่มีความเข้มข้นต่างกัน พบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2,4-D มีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นใหม่จะขึ้นกับส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง แคลลัสที่มีอายุน้อยจะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสที่มีอายุมาก และแคลลัสจากส่วนของรากจะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าส่วนของใบ และลำต้น

Maeda (1980) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Aichiasahi และ Kinmaze โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นที่ 10^{-5} โมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น 15 วันจะเกิดแคลลัสที่ scutellum ต่อจากนั้นประมาณ 50 วัน แคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และส่วนของใบ ราก ลำต้นและ coleoptile ก็สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้

Inoue และ Maeda (1981) รายงานว่า การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวต้องใช้ไคเนตินกระตุ้นในขั้นสุดท้าย ในทางตรงข้ามถ้าใช้ Abscisic acid (ABA) จะเป็นตัวยับยั้งไม่ให้มีการสร้างยอด โดยถ้าเติม ABA ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วจึงเติมไคเนตินจะทำให้แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้มาก

Reddy (1981) พบว่าการใช้อาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ และเมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เมื่อต้นใหม่สูงประมาณ 8-10 เซ็นติเมตร จึงนำออกมาปลูกในสภาพแวดล้อมทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเกิดต้นใหม่จากเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 โดย Raina และคณะ ในปี 1987 พบว่าสามารถเจริญเป็นแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้โดย ใช้อาหาร MS ที่เติม 2,4-Dหรือ 2,4,5-T ในปริมาณ 1 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสและเมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติมทริปโตเฟน 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสสามารถเจริญ และพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

เผดิม (2536) ได้ทำการทดลองหาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว 6 สายพันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 บาสมาติ 370 กข 15 นางมล 54 ประดู่แดง และปทุมธานี 60 พบว่าในสภาวะที่มีแสงจะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าที่มืด ผลการทดลองเป็นดังนี้

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 บาสมาติ 370 และกข 15 เกิดแคลลัสดีที่สุดที่อาหาร MS ที่มีอัตราส่วนระหว่าง NAA กับไคเนตินเป็น 5 ต่อ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข้าวนางมล S4 และประดู่แดง เกิดแคลลัสได้ดีสุดบนอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่าง NAAกับไคเนตินเป็น 4 ต่อ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข้าวปทุมธานี 60 เกิดแคลลัสได้ดีสุดบนอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่าง NAAกับไคเนตินเป็น 5 ต่อ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตรชักนำต้นอ่อนจากแคลลัสที่ดีที่สุดสำหรับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และนางมล S4 คือ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมความเจริญ พันธุ์ปทุมธานี 60 ใช้อาหาร MS ที่มีไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ กข 15 ใช้ MS ที่มีไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ข้าวประดู่แดงและบาสมาติ 370 ใช้อาหาร MS สูตร ไคเนติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประภา (2537) ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรีย์ และปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำเอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ เคซีนไฮโดรไลเสท 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสงจะมีการสร้างแคลลัสสูงถึง 96.3 เปอร์เซ็นต์ ขนาดแคลลัสใหญ่สุดโดยเฉลี่ย 9.4 มิลลิเมตร แล้วนำไปพักในจานแก้วปิดฝา 7 วัน ก่อนย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้พัฒนา พบว่าสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ในอัตราสูงกว่าการย้ายลงโดยไม่ทำให้แห้ง และสูตรอาหารที่ชักนำให้ แคลลัสพัฒนาเป็นต้นมี 2 สูตร คือ MS ที่มี IAA 1:BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชักนำเป็นยอดได้ 45.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ละแคลลัสมียอดเฉลี่ย 7.9 ยอด และสูตร MS ที่มี IAA 1: BA 4 มิลลิกรัมร่วมกับ สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำแคลลัสเป็นยอดได้ 45.5 เปอร์เซ็นต์โดยแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.7 ยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Poeaim และ คณะ (1995) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอแก่ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่เติมแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Ella และ Zapata (1993) รายงานเกี่ยวกับการเติมแอล-โพรลีน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวอินดิคาจะช่วยในการเจริญของแคลลัส และเซลล์ที่เกิดใหม่จะหลุดออกจากแคลลัสเดิมได้ง่าย

Poeaim และ คณะ (1996) รายงานว่าการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับนำเซลล์ไปเลี้ยงเป็นต้นใหม่และการแยกโปรโตพลาสต์ ส่วน Utomo และ คณะ(1995) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวอเมริกา 5 พันธุ์ คือ Mercury Lacassine Maybelle Cypress และ Lemont สามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

อนุรักษ์ และ นิตย์ศรี (2539) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุดคือ สูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 4-10 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว อนุรักษ์ และ นิตย์ศรี (2542) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารแข็งสูตร NB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร เลือกแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่น ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่มีน้ำตาลมอลโตส และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้เซลล์แขวนลอยที่มีขนาดสม่ำเสมอ สามารถเพิ่มจำนวนได้มากและรวดเร็ว และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้

Elumalai Sivamani และคณะ (1996) ศึกษาการคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณภาพจากข้าวอินดิคา เพื่อนำไปย้ายยีนโดยการยิงอนุภาคสู่เซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้แคลลัสคุณภาพดีจำนวนมาก การทดลองนี้ใช้ข้าวพันธุ์ TN 1 สกุลอินดิคา เลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร NBKNB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะไม่มีแสง เปลี่ยนอาหาร 4 ครั้งทุก 2 อาทิตย์ แคลลัสที่ไม่จับกันแน่นจะย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร RN เพื่อชักนำให้เกิดต้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงที่มีความเข้ม 100 – 125 มิลลิเมตรต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อวัน ราววันที่ 10 จะเริ่มเกิดรากเล็กๆ จากนั้นชักนำบนอาหาร RN ให้เกิดต้นข้าวที่มีระบบราก สมบูรณ์ แล้วจึงย้ายลงดินปลูกในสภาวะควบคุมสภาพแวดล้อมเพื่อเก็บเมล็ด สำหรับแคลลัสที่จะนำไปย้ายยีนจะย้ายลงอาหาร NB แล้วจึงย้ายยีนโดยยิงอนุภาคจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NBH คัดเลือกแคลลัสที่เจริญได้มาเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร NBKNB พบว่าข้าวอินดิคาแต่ละพันธุ์ไม่สามารถใช้ วิธีเดียวกันได้ ทั้งในขั้นตอนการเพาะเลี้ยง และการชักนำให้งอกใหม่

Shipins Zhans (1996) ได้ทำการทดลองในข้าวอินดิคาสายพันธุ์ IR24 JR64 JR72 และ IR 57311–95–2–3 ภายในเวลา 6-8 สัปดาห์ จะเกิดการงอกใหม่จากแคลลัสอายุ 3-4 สัปดาห์ โดยต้นข้าวที่งอกใหม่จะได้รับการย้ายยีน โดยนำพลาสมิดที่บรรจุยีนควบคุม ไฮโกรมัยซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส (hph) มีความสามารถต้านทานไฮโกรมัยซิน บี และมียีนเบต้ากลูคูโรนิเดส (β - glucorunidase uid A) ทำให้ต้นที่งอกใหม่ต้านทานไฮโกรมัยซิน บี และ แสดง uid A (GUS) gene การงอกของต้นแม่ (R_0) เป็นไปอย่างปกติขณะที่ต้น R_0 และ R_1 พบว่าต้นที่มีความต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน ยังคงมียีน hph จากแมนเดเลียแฟชั่น และโปรโตคอลของการย้ายยีนข้าวอินดิคาได้ถูกสร้างขึ้น

Laxmi และReddy (1997) ได้ศึกษาหาวิธีเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสให้งอกจากอับละอองเกสรของข้าวอินดิคา 4 พันธุ์ คือ Rasi TH Ptb – 33 และ IR – 24 โดยทำการเก็บอับละอองเกสรจากข้าวในเรือนเพาะตาข่าย มาเก็บในที่เย็น 7 – 12 วัน ก่อนจะเลี้ยงในอาหาร N_6 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเติมไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มอลโทส 6 เปอร์เซ็นต์ และ$AgNO_3$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ TH เพิ่มถึง 34 เปอร์เซ็นต์ 28เปอร์เซ็นต์ ในPtb–33 24 เปอร์เซ็นต์ใน Rasi และ 8 เปอร์เซ็นต์ในข้าว IR – 24 เมื่อผ่านไป 20 วัน จึงย้ายสู่อาหาร $^1/_2$ MS ที่มีซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน ($^1/_2$ MNBK) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการงอกใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่าซิลเวอร์ไนเตรท มีส่วนทำให้เกิดสีเขียวในแคลลัส ส่วนโพรลีน และทริปโตเฟน ช่วยชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซีส

Herry และคณะ (1995) ได้รายงานว่าเซลล์แขวนลอยจะมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ และนิยมใช้ในการทำโพรโทพลาสต์ เซลล์แขวนลอยสามารถเพาะเลี้ยงจากเอ็มบริโอ ไมโครสปอร์ และอวัยวะของพืช โดยผลกระทบที่มีต่อเซลล์แขวนลอยคือสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ส่วนปัจจัยที่ส่งผลต่อการคัดเลือกเซลล์แขวนลอย คือจำนวนครั้งของการเปลี่ยนอาหารเลี้ยง และอายุของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bhattacharjee และคณะ (1998) ได้ศึกษาพืชต้นใหม่จากโพรโทพลาสต์ที่ได้จากกระบวนการ somatic hybridization และcybridization โดยนำเอ็มบริโอของข้าวสายพันธุ์ผสมระหว่าง IR 36 และ IR 65 มาเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอยโดยจะมีการเปลี่ยนอาหารใหม่ โพรโทพลาสต์ที่ได้จะแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ แล้วเจริญเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ ใช้พืช IR 36 31 พันธุ์ และ 28 พันธุ์ใน IR 65 ในวันที่ 30 จะแสดงผลบวกบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพมีการเจริญเติบโตสูง รวมถึงศึกษาความแตกต่างของ protoclonal ซึ่งในต้นนั้นน้ำหนักของ IR 36 จะแสดงนัยสำคัญเป็นบวก และเป็นลบเมื่อเปรียบเทียบความยาวช่อดอกและความสูงพืชกับอนุพันธ์ของเมล็ดที่ควบคุมในทางกลับกันส่วนต่างๆของพืช R_0 R_1 และ R_2 จะให้ผลเหมือนกันใน IR 65 จึงไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอนุพันธ์เมล็ดที่ควบคุมไว้ การใช้โพรโทพลาสต์เป็นการประหยัดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์

Chen และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษากรรมวิธีในการย้ายยีนในข้าว โดยวิธีใช้เครื่องยิงอนุภาค ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สำคัญมีเป้าหมายสูงสุด คือ การศึกษาสภาพการเลี้ยงแคลลัสในสภาวะที่มีความเข้มของคาร์โบไฮเดรตเป็น 0.6 โมลาร์ ก่อน และหลังการย้ายยีน จากอายุ 4 9 14 และ 19 วัน พบว่าระหว่างวันที่ 9 และ 14 หลังการเปลี่ยนอาหารจะให้จำนวนของแคลลัสที่ย้ายยีนสำเร็จจำนวน 22.2 ± 3.9 และ 18 ±1.9 จาก 100 แคลลัส หลังจากย้ายยีนแล้ว 8 สัปดาห์ แคลลัสเฉลี่ยที่มียีนที่ย้ายยีน มีค่าเฉลี่ย 22.3±9.7 ต่อ 100 แคลลัส และ22.4±8.0 ในเซลล์แขวนลอย จากวิธีนี้ถูกใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาการย้ายยีนในข้าว และคาดว่าสามารถขยายงานไปสู่การศึกษาการย้ายยีนอื่นอีกต่อไป

การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือราก (Shoot or Root Primoidia)

การเจริญเติบโต และพัฒนาของเซลล์พาเรนไคมาเป็น ยอด ราก ใบหรือดอกนั้น เกิดจาก 2 กระบวนการ คือ

1. Organogenesis คือ การเกิดยอด รากหรืออวัยวะอื่นโดยการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาใกล้เคียงเป็น meristematic cell ขนาดเล็ก แวคิวโอลเล็ก และมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้น มีอัตราแบ่งตัวสูง อาจเรียกได้ว่าเมอริสทิมอยด์ ที่สามารถเจริญเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก ได้อย่างอิสระตามแต่จะได้รับการกระตุ้น

2. Embryogenesis คือ การเจริญเป็นอวัยวะโดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง และพัฒนาเหมือนไข่หลังผสม คือ จะมีการแบ่งตัว และเจริญเป็น Proembryo Globular-shaped embryo Heart-shaped embryo Torpedo-shaped embryo และ Embryo ตามลำดับ ซึ่งปลายหนึ่งของ embryo จะเจริญเป็นยอด และอีกปลายหนึ่งจะเจริญเป็นราก ไม่ว่าจะผ่านออแกโนเจเนซิส หรือเอ็มบริโอเจเนซีส ก็ตาม การเกิดมอโฟเจเนซีส จะมีการพัฒนาของเซลล์ใน 2 ระยะ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 1 เจริญ และพัฒนาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นจุดกำเนิดยอดหรือรากโดยต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมีในอาหาร อุณหภูมิ และแสงทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง มีแวคิวโอลเล็ก และไซโตพลาสซึมที่เข้มข้นขึ้น สร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิกเพิ่ม รวมถึงมีการแบ่งตัวเร็วมาก กลุ่มเซลล์นี้จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดยอด รากหรือเอ็มบริออยด์

ระยะที่ 2 เมื่อเกิดจุดกำเนิดยอดหรือรากหรือเอ็มบริออยด์แล้ว หลังจากได้รับอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมจะเจริญเป็นต้น และ/หรือ รากที่สมบูรณ์ได้โดย ไพบูลย์(2524) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์มีดังนี้

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

อโกรแบคทีเรียม

ลักษณะทั่วไปของอโกรแบคทีเรียมตามที่ Buchanan และGibbons (1974) ได้ทำการศึกษาเอกสารเพื่อการจัดจำแนกจุลินทรีย์ พบว่าอโกรแบคทีเรียม เป็นจุลินทรีย์ที่มีแหล่งอาศัยในดินอยู่ในสกุล Rhizobiaceae ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรง ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เป็นเชื้อที่มีชีวิตอย่างอิสระในดินหรือน้ำ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ แฟลกเจลลา ไม่สร้างสปอร์ เมื่อเจริญบนอาหารที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตจะสร้างเมือกที่เป็นน้ำตาลเชิงซ้อนขึ้นรอบๆเซลล์ โคโลนีไม่มีสี ผิวเรียบ บางสายพันธุ์มีผิวที่ขรุขระ ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญแต่ สามารถเจริญได้ในที่ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนต่ำ เช่น บริเวณบาดแผลของเนื้อเยื่อพืช เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pHที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.0-9.0 เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปม โดยทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์คอร์เทกซ์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว พบทั้งบนราก และลำต้น (ไพโรจน์, 2526)

อโกรแบคทีเรียม สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (Buchanan และ Gibbons, 1974) ดังนี้

1. ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง 3-ketolactose
   - 1.1 ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *A. tumefaciens*
   - 1.2 ไม่ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *A. radiobacter*
2. ไม่ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และเกลือแอมโมเนียม เป็นแหล่งไนโตรเจน สร้าง 3-ketolactose
   - 2.1 ทำให้เกิดรากฝอย คือ *A. rhizogenes*
   - 2.2 ทำให้เกิดปุ่มปมบนราสเบอรี่ คือ *A.rubi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสมิดใน *A. tumefaciens*

A.tumefaciens มีพลาสมิดขนาด 140-235 กิโลเบส เรียกว่า Tumor-inducing หรือ Ti Plasmid ซึ่งสามารถทำให้พืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดเกิดอาการ crown gall tumor คือพืชที่มีลักษณะเป็นปุ่มปม เนื่องจากเนื้อเยื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว หลังจากได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลบนต้นพืช (Willmizer และคณะ., 1982) การเกิดปุ่มปมจะเข้าไปขัดขวางการเจริญของพืชหรือทำให้พืชตาย เพราะเข้าไปรบกวนระบบหมุนเวียนของน้ำ และอาหารในพืช (Hooykaas และSchilperoort., 1984) และเมื่อนำเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะไม่พบแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค แต่เซลล์ที่ เปลี่ยนแปลง (Transformed cell) จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส (เนื้อเยื่อพืชที่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ) หรือ Teratoma (เนื้อเยื่อที่พัฒนาไปเป็นยอดอ่อน และลำต้นอย่างเห็นได้ชัด) โดยไม่ต้องเติมออกซิน และไซโตไคนินซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นในการเจริญของเนื้อเยื่อปกติ

ส่วนของ T-DNA (transferred DNA) ใน Ti plasmid จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อ ทำให้เกิดเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปม ยีนในส่วน T-DNA มีบทบาททำให้พืชสร้างโอปีน (Opine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน โอปีนมี 2 ชนิด คือ Octopine และNoplaine นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้าง Agropine เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนคือ octopine dehydrogenase หรือ nopaline dehydrogenase ซึ่งถูกกำหนดโดยยีนบนส่วน T-DNA

T-DNA มียีนควบคุมการสร้างฮอร์โมนซึ่งมีผลกระตุ้นให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัว และเจริญอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มปม

Ti plasmid ประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย (marker gene)และยีนรายงานผล (reportor gene) ที่มีข้อแตกต่างกันคือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะบางประการเพื่อทำให้การคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีน โดยการย้ายยีนให้สามารถแยกออกได้โดยง่ายเพื่อใช้ตรวจสอบผลของการย้ายยีน (ตารางที่ 1) ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และสามารถแสดงออกได้มากน้อยเพียงไรในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใด (ตารางที่ 2) ในพืชยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลอาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบว่าทำงานได้ตลอดเวลาในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะต่ออยู่กับส่วนของ DNA ที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 แสดงตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช

ยีนเครื่องหมาย	เอนไซม์ที่สร้างได้	ลักษณะที่แสดงออก
Hpt	Hygromycin phosphotransferase	ต้านทานไฮโกรไมซิน
Dhfr	Dihydrofolate reductase	ต้านทานเมทโธทรีเซส
CAT	Chloramphenical acetyltransferase	ต้านทานคลอแรมเฟนิคอล
NPT II	Neomycin phosphotransferase	ต้านทานกานามัยซิน
Aro A	5 – enolpyruvul shilimate – 3 phosphate synthase	ต้านทานกัยโฟเสท

ตารางที่2 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 ของพลาสมิด Ti และโปรโมเตอร์จากไวรัสของกะหล่ำ cauliflouuer mosic virus (CaMV 35 S promoter)

กลไกการถ่ายโอนยีนของ *A. tumefaciens*

ในการศึกษากลไกของอโกรแบคทีเรียมนี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับ *A. tumefaciens* ในปี 1979 Ohyama และคณะ ศึกษาพบว่าหลังจากที่มีการปลูกเชื้อบนชิ้นส่วนพืชแล้ว แบคทีเรียจะใช้เวลาประมาณ 20 – 60 นาที ในการเชื่อมติดกับเซลล์พืช ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของพืชและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเชื่อมติดไม่ต้องการ Ca^{2+} และถ้ามีจะเกิดการยับยั้งการเชื่อมติด อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 – 30 องศาเซลซียส pH ที่เหมาะสมคือ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบของการ infect ของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการยึดเกาะของ *A. tumefaciens* กับยาสูบและแครอท (รูปที่ 1) คือ

ระยะที่1 แบคทีเรียจะยึดเกาะที่ตำแหน่งเป้าหมาย (Receptor = R) ที่จำเพาะบนผิวของเซลล์พืช

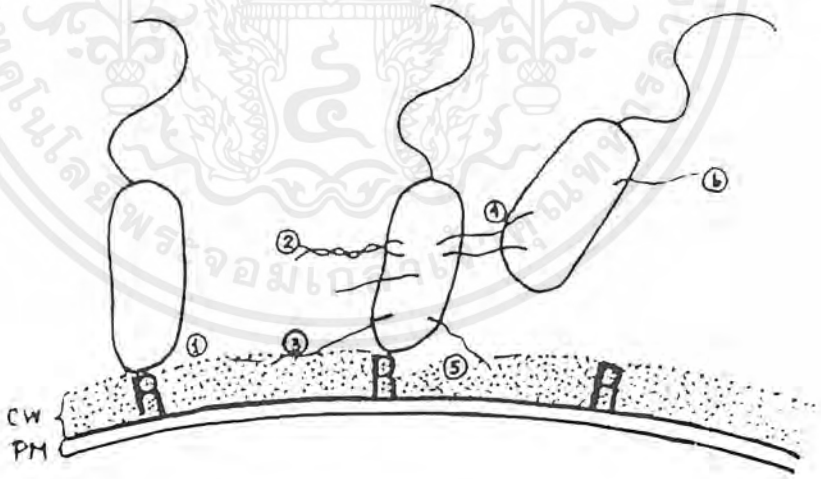
ระยะที่2 หลังจากเกิดการยึดเกาะแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยเซลลูโลส

ระยะที่3 เส้นใยเซลลูโลสจะยึดเกาะแบคทีเรียที่ผิวของผนังเซลล์ (CW) ซึ่งพืชไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและแยกแบคทีเรียออกจากเซลล์พืชได้

ระยะที่4 เส้นใยที่มีความยาวจะยึดกับแบคทีเรียตัวอื่น

ระยะที่5 แบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชจะปล่อยเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชทำให้เกิดการสัมผัสระหว่างแบคทีเรียกับพลาสมาแมมเบรน (PM) ของเซลล์พืช ต่อมาจะทำให้เกิดการเคลื่อนย้าย Ti plasmid จากแบคทีเรียไปสู่เซลล์พืช

ระยะที่6 แบคทีเรียที่ถูกจับโดยเส้นใยจะมีการสร้างเส้นใยอีกด้วยตัวเองทำให้มีการยึดเกาะทางอ้อมกับเซลล์พืชและเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชผ่านตำแหน่งเป้าหมายและเส้นใยเซลลูโลส



รูปที่1 ภาพแบบจำลองการยึดเกาะของ *A. tumefaciens* ตัวเลขในวงกลมแสดงถึงระยะต่างๆตามที่กล่าวถึง ที่มา : Matthysse และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย้ายยีนในข้าว

วิชัย (2538) ได้เคยกล่าวถึงการย้ายยีนในเซลล์พืชไว้ว่า คือการย้ายยีนจากแหล่งภายนอกเข้าสู่เซลล์พืชแล้วส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งอาจทำให้พืชนั้นมีความสามารถแสดงลักษณะของยีนที่ต้องการได้ ต้นพืชที่มียีนจากแหล่งอื่นสอดแทรกเข้าไปอยู่ในจีโนมและแสดงลักษณะของยีนนั้นออกมาได้ เรียกว่าพืชจำลองพันธุ์ กระบวนการที่ใช้ในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชสามารถแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการใหญ่ๆ ได้แก่

1. การย้ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง (Direct Gene Transfer)

ยีนที่จะทำการย้ายนั้นจะได้รับการย้ายเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง ไม่จำเป็นต้องมีพาหะหรือตัวพาทำหน้าที่เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ เช่นการใช้กระแสไฟฟ้า การฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ การใช้สารเคมี และการใช้เครื่องยิงอนุภาค ในการใช้กระแสไฟฟ้าและสารเคมี PEG นั้น เซลล์เป้าหมายในการรับยีนหรือดีเอ็นเอส่วนใหญ่แล้วจะเป็นโพรโทพลาสต์ ดังรายงานของ Peng และคณะ (1992) และ Dattaและคณะ(1992)ว่าประสบความสำเร็จในการใช้สารPEGในการถ่ายยีนเข้าสู่โพรโทพลาสต์ของข้าวอินดิคาและข้าวจาปอนิคา (Uchimiya และคณะ.,1986;Zhang และ Wu.,1991) นอกจากนี้แล้ว PEG ยังสามารถนำมาใช้ในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แขวนลอยขนาดเล็กของข้าว (Lee และคณะ.,1991) ได้อีกด้วย สำหรับการใช้กระแสไฟฟ้าในการย้ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าวนั้นพบว่ามีรายงานเฉพาะในข้าวจาปอนิคาเท่านั้น (Toriyama และ.,1988;Zhang และคณะ.,1988; Tada และคณะ .,1990;Toki และคณะ.,1992) ส่วนในข้าวอินดิคานั้นยังไม่พบว่ามีรายงานความสำเร็จด้วยการย้ายยีนด้วยวิธีนี้ แต่พบว่ามีรายงานการย้ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอของข้าวพันธุ์ IR36 โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Xu และLi.,1994) ส่วนข้าวจาปอนิคานั้นมีรายงานถึงการย้ายยีนเข้าสู่ส่วนใบของต้นข้าวด้วยกระแสไฟฟ้า (Dekeyser และคณะ .,1990) นอกจากนี้แล้วยังมีการพยายามประยุกต์ใช้เทคนิคทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน คือ ใช้สารเคมี PEG ร่วมกับการใช้กระแสไฟฟ้าในการย้ายยีนเข้าสู่โพรโทพลาสต์ของข้าว Taipei 309 (Yang และคณะ., 1988)

2. การย้ายยีนโดยใช้พาหะ (Vector Mediated Gene Transfer)

วิธีการนี้เป็นการใช้พาหะ (Vector)ในการพายีนเข้าสู่เซลล์พืช พาหะที่ได้รับการพัฒนาจนประสบความสำเร็จและได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง คือ อโกรแบคทีเรียม ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งมี Ti plasmid ทำหน้าที่เป็นพาหะส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าไปเชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอในโครโมโซมพืช วิธีนี้ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางเนื่องจากขั้นตอนการใช้ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถใช้ได้กับในหลายๆ ส่วนของพืช ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

มีประสิทธิภาพสูง ข้อจำกัดที่สำคัญคือ ให้ผลดีกับเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้นเพราะว่าในสภาพธรรมชาติแล้วเชื้อชนิดนี้จะไม่เข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Hooykass-Van Slogteren , 1984) จึงได้มี การศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการย้ายยีนด้วย อโกรแบคทีเรียม แม้จะมีรายงานความสำเร็จของการย้ายยีนโดยใช้ อโกรแบคทีเรียม ทั้งในข้าวจาปอนิคา (Li และคณะ., 1992 ; Hiei และคณะ., 1994)และข้าวอินดิคา (Chan และคณะ., 1993 ; Xu และคณะ., 1993) แต่ยังคงอยู่ในวงจำกัด

Chan และคณะ (1992) ได้ทำการย้ายยีนโดยใช้ อโกรแบคทีเรียม ในข้าวอินดิคา สายพันธุ์ Taichung Native 1 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีน และผลของเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่ง (PSC) ในอาหารที่ใช้เลี้ยงอโกรแบคทีเรียม ร่วมกับเซลล์พืช โดยทำการย้ายยีนที่ใบ ลำต้น และรากของต้นอ่อนข้าว อายุ 3 – 4 วัน คัดเลือกแคลลัสที่เปลี่ยนสภาพโดยเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ G418 พบว่า มีเพียงแคลลัสจากรากในอาหารที่มี PSC เท่านั้นที่สามารถต้านทานได้ นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อแล้ว อายุของชิ้นส่วนก็มีความสำคัญ ในการย้ายยีนพบว่าต้นอ่อนของข้าวอายุ 3 – 4 วัน เหมาะสมที่สุดในการย้ายยีน และจากการทดลองย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม ที่เกิดการกลายพันธุ์บริเวณยีน vir หรืออโกรแบคทีเรียม ที่มีส่วน T – DNA ไปที่รากของต้นอ่อน พบว่าไม่มีแคลลัสที่เปลี่ยนสภาพเกิดขึ้นเป็นการยืนยันว่า ยีน vir และส่วน T – DNA มีความสำคัญมากต่อการย้ายยีน นอกจากนั้นยังพบว่าการย้ายยีน โดยใช้ อโกรแบคทีเรียมที่มีเวกเตอร์แบบโคอินทริเกรต เช่น C58C1 (Pgv2260 :: NG1) จะให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ อโกรแบคทีเรียม ที่มีเวกเตอร์แบบไบนารีเช่น pBI121 การเติมสารประกอบฟีนอลลิก เช่น อะซิโตซิลิงโกน ในอาหารเลี้ยงจะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน vir ส่งผลเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายยีน

Hiei และคณะ (1994) ได้ทดลองย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม ในข้าวจาปอนิคา 3 สายพันธุ์ คือ Tsukinohikari Asanohikari และ Koshihikari โดยศึกษาผลของสภาวะในการเลี้ยงอโกรแบคทีเรียม ร่วมกับเซลล์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม และชนิดของเวกเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เลี้ยงอโกรแบคทีเรียมร่วมกับเซลล์พืช คือ การเลี้ยงในอาหารที่ มีอะซิโตซิลิงโกน ที่อุณหภูมิ 22 – 28 องศาเซลเซียส หากไม่เลี้ยงในสภาวะดังกล่าวจะทำให้การย้ายยีนไม่ประสบความสำเร็จ จากการเปรียบเทียบชนิดของเนื้อเยื่อในการย้ายยีน (ปลายยอด รากต้นอ่อน สคิวเทลลาเอ็มบริโอที่ยังไม่เจริญเต็มที่ แคลลัสจากรากอ่อน แคลลัสจากสคิวเทลลา และเซลล์แขวนลอยที่ชักนำจากสคิวเทลลา) โดยตรวจการแสดงออกของยีน GUS พบว่า แคลลัสจากสคิวเทลลามีการแสดงออกของยีนGUS มากกว่าเนื้อเยื่ออื่น แคลลัสจากสคิวเทลลาจึงเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่จะใช้ในการถ่ายยีน ปัจจัยสุดท้ายที่มีต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35869

ประสิทธิภาพของการย้ายยีนคือ สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียมและเวกเตอร์ที่ใช้ จากการทดลอง พบว่าในข้าว Tsukinohikari และ Koshihikari ที่ถูกย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LAB4404 (pTOK223) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ธรรมดา (ordinary stain) และมีเวกเตอร์แบบ superbinary จะมีประสิทธิภาพในการย้ายยีนดีกว่าใช้ อโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ LBA 4404 (pIG121Hm) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ธรรมดาที่มีเวกเตอร์แบบไบนารีและ EHA101 (p IG121Hm) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มี ความรุนแรงในการบุกรุกพืช และมีเวกเตอร์แบบไบนารี ส่วนสายพันธุ์ EHA101 (pTOK223) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงและมีเวกเตอร์แบบ superbinary จะมีประสิทธิภาพในการย้ายยีนต่ำมาก

Dekeyser และคณะ (1989) กล่าวถึงการศึกษาที่มีการทดลองใช้สารคัดเลือกและยีนที่ต้านทานต่อสารคัดเลือกเหล่านั้นเป็นจำนวนมาก สารคัดเลือกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือกานามัยซิน G418 และไฮโกรมัยซิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ แอนติไบโอติก ที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (translation) ของเซลล์ สารเหล่านี้สามารถทำให้เสียคุณสมบัติได้ด้วยปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่น โดยใช้ Tn5 neonycinphospho-transferase II (*npt-II*) gene หรือ Hygromycin B resistance gene ที่ได้จาก *Escherichai coli* นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาชนิดของโปรโมเตอร์และเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกให้เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสข้าวที่ได้รับการย้ายยีนโดยใช้โปรโมเตอร์ 6 ชนิดที่ต่อกับยีน *npt-II* ในจำนวนนี้มีโปรโมเตอร์ 1' transcript 2' transcript ของ ออกโทปีน T_R – DNA พบว่าโปรโมเตอร์ 2' transcript มีประสิทธิภาพมากกว่าโปรโมเตอร์ nos และโปรโมเตอร์1' transcript 10 เท่า นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวมีความว่องไวต่อสารคัดเลือกเมธโททรีเซนฟอสฟิโนทรีซิน และบลีโอมัยซินที่มีความเข้มข้นต่ำแต่สามารถต้านทานG418และไฮโกรมัยซินความเข้มข้นปานกลาง ส่วนกานามัยซินความเข้มข้นสูงนั้นยับยั้งการเจริญของแคลลัสข้าวได้เพียงส่วนน้อย สรุปว่าควรเลือกใช้บลีโอมัยซินซึ่งสามารถแยกเซลล์ที่ได้รับการย้ายยีนกับเซลล์ปกติได้อย่างชัดเจน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังพบว่าในเซลล์ที่ได้รับการย้ายยีน หากมีจำนวนชุดของยีนหลายชุด เซลล์จะมีความต้านทานต่อสารคัดเลือกได้ดีกว่า ในกรณีที่พบชุดยีนเพียงชุดเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่ยีนนั้นมีระดับการแสดงออกต่ำ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี southern blot พบว่า กรณี ที่มีชุดยีนชุดเดียวจะมีความผิดปกติเกิดขึ้นบนชิ้น DNA เสมอเช่น มีการขาดหายไปของยีน *npt-II*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวพันธุ์ไทย พันธุ์ กข 6 (KD6) พันธุ์ขาวดอกมะลิ Khao Dark Mali 105 (KDML 105) พันธุ์ชัยนาท (Chainat) และพันธุ์สุพรรณบุรี 60 Supanburi 60 (SP 60)
2. เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* 3 สายพันธุ์ คือ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404
3. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร NB LB N_6 และ สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ 2,4-D NAA ซีเอติน ไคเนติน และBAP
5. กรดอะมิโน ได้แก่ แอลโพรลีน และ เคซีนไฮโดรไลเสท
6. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
7. ยาปฏิชีวนะ เช่น คานามัยซีน ไฮโกรมัยซิน บี และ เซโฟแทกซิน
8. อะซิโตไซลิงโกน
9. บีกเกอร์
10. ขวดรูปชมพู่
11. ปิเปตต์
12. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
13. จานแก้ว
14. แท่งแก้วคน
15. กระบอกตวง
16. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด
17. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
19. หม้อนึ่งความดัน
20. มีดผ่าตัด
21. ปากคีบ
22. อะลูมิเนียมฟลอย
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์
24. ตู้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. เครื่องเขย่า
26. ไมโครเวฟ
27. ตู้บ่มเชื้อ
28. พาราฟิล์ม
29. กล้องสเตอริโอ
30. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ภาพ
31. ตู้อบ
32. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์
33. ไมโครปิเปตต์และทิปขนาดต่างๆ
34. ตัวกรอง

วิธีการทดลอง

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส

1.1 เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 ชัยนาท และ กข 6

1.2 แกะเปลือกเมล็ดข้าว พันธุ์ละ 200 เมล็ด ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 นาที

1.3 เทแอลกอฮอล์ทิ้งแล้วฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารเปียกใบ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 75 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบที่ทำให้เมล็ดข้าวเคลื่อนที่สัมผัสกับสารละลายคลอรอกซ์อย่างทั่วถึงเป็นเวลา 45 นาที

1.4 เทสารละลายคลอรอกซ์ออก ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

1.5 ย้ายเมล็ดข้าวออกจากขวดรูปชมพู่ ระวังไม่ให้สัมผัสกับปากขวด มาวางบนกระดาษทิชชู ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับน้ำออกจากเมล็ด คีบเมล็ดวางบนอาหารแข็งสูตร NB 2 สูตร ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตรที่เหมือนกัน และฮอร์โมน NAA ที่แตกต่างกัน คือ 0.5 กับ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จานละ 20 เมล็ด

1.6 เก็บไว้ในที่มืดควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันจะเห็นว่ามีแคลลัสเจริญจากเมล็ดข้าว ตรวจสอบและบันทึกผล

1.7 ตัดแคลลัสแล้วย้ายอาหารใหม่ทุก 14 วัน จนแคลลัสมีลักษณะจับตัวกันอย่างหลวมๆจึงย้ายลงสู่อาหารเหลว เพื่อทำการทดลองที่ 2 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดต้นใหม่

2.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร N_6 ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร แล้วจึงเทอาหาร N_6 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำแคลลัสจากการทดลองที่ 1 ใส่ตามลงไป

2.2 วางทิ้งไว้ 3 วันที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสแล้วจึงวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสม เลี้ยงเป็นเวลา 90-100 วัน จะเกิดเป็นเซลล์แขวนลอย

2.3 คัดเลือกเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์ คือขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี60 ชัยนาท และ กข6
และ มาวางบนอาหารแข็งสูตร NB 4 สูตรที่แตกต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร
BAP 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตร ที่ 2 NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร
BAP 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 3 NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร
BAP 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
สูตรที่ 4 NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร
BAP 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ตรวจสอบความสามารถในการเกิดต้นใหม่ของข้าว ในอาหารทั้ง 4 สูตรและบันทึกผลการทดลอง

3. การศึกษาความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี

3.1 คัดเลือกเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์ คือขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 ชัยนาท และ กข6 มาวางบนอาหารแข็งสูตร NB ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ฮอร์โมน NAA และ ไฮโกรมัยซิน บี ความเข้มข้นที่ 0 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.3 ตรวจความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของข้าวแต่ละสายพันธุ์

3.4 บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ศึกษาการย้ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* 3 สายพันธุ์ คือ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 (ภาคผนวกที่1 ก)

4.1 เตรียมอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 เลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็งสูตร LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวกที่1 ข)

4.3 ย้ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4 นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.5 คัดเลือกเซลล์แขวนลอยที่สมบูรณ์ ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วเทอาหารเหลวสูตร N_6 ลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร เติมอะซิโตไซลิงโกนที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลายของเชื้ออโกรแบคทีเรียม ที่มีค่าการดูดกลืนแสง 0.8-1.0 ลงไปแล้ว เขย่าให้เข้ากัน

4.6 ดูดอาหารเหลวออก แล้วจึงทำการล้างเชื้อด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อผสมเซโฟแทกซินที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้าง 2 รอบ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำแคลลัสออกมาวางบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4.7 แบ่งแคลลัสที่ล้างแล้วออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งมาวางบนอาหารแข็งสูตร NB ซึ่งประกอบด้วย NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เซโฟแทกซิน ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีไฮโกรมัยซิน บี ความเข้มข้นตามความสามารถในการต้านทานของเซลล์แขวนลอยของข้าวแต่ละสายพันธุ์

4.8 อีกส่วนหนึ่งนำไปทำการตรวจสอบผลของการย้ายยีน โดยการเติม GUS-buffer (ภาคผนวกตารางที่ 1) ให้ท่วมแคลลัส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.9 ดูด GUS-buffer ออก แล้วเติมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ลงไปให้ท่วมแคลลัส จากนั้นทำการตรวจผลการย้ายยีนในแคลลัสผ่านกล้องสเตอริโอ

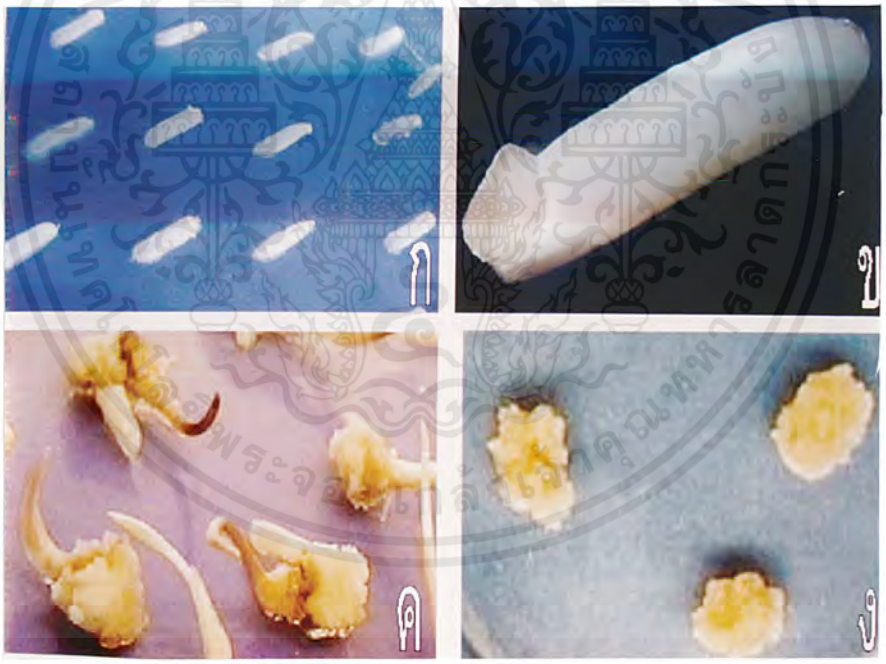
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส

เอ็มบริโอแก่ของข้าวนั้นจะเกิดเป็นแคลลัสที่บริเวณจมูกข้าว สามารถสังเกตได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน โดยจะพบว่าเกิดกลุ่มเซลล์ที่เกาะเป็นก้อนสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 2) จากการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้กลายเป็นแคลลัสคือ อาหารแข็งสูตร NB ที่มีฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 2 แสดงการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส

ก. วันแรกของการเริ่มต้นเลี้ยงแคลลัส

ข. แสดงแคลลัสที่มีอายุ 3 วัน

ค. แสดงแคลลัสที่มีอายุ 12 วัน

ง. แสดงแคลลัสที่มีอายุ 17 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดต้นใหม่ในข้าว 4 พันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 1 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 46.67 33.33 53.33 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 41.66 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	5	33.33
15	8	53.33
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		41.66

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 2 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 53.33 22.67 33.33 และ 60.00 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 43.33 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมี ปริมาณสารดังนี้

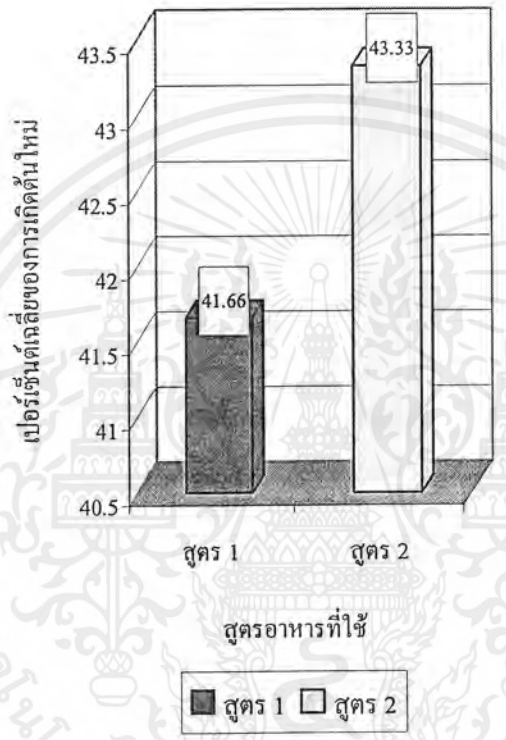
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	8	53.33
15	4	22.67
15	5	33.33
15	9	60.00
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		43.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 1 และ 2 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 3) พบว่าอาหารสูตรที่ 2 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 1



รูปที่ 3 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ในอาหารแข็ง NB สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 3 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 60.00 40.00 33.33 และ 66.67 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 50.00 (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ (KDML) ในอาหารสูตร 3 ซึ่งมี ปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	8	53.33
15	4	22.67
15	5	33.33
15	9	60.00
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		43.33

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 4 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 46.67 33.33 26.67 และ 66.67 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 43.33 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ (KDML) ในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมี ปริมาณสารดังนี้

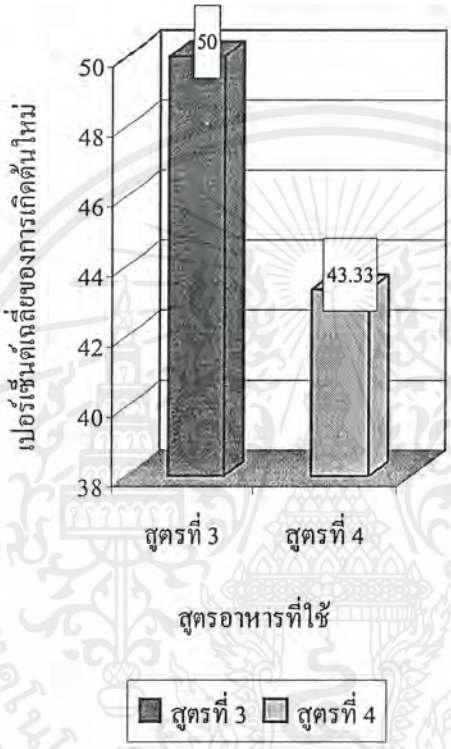
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	5	33.33
15	4	26.67
15	10	66.67
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		43.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

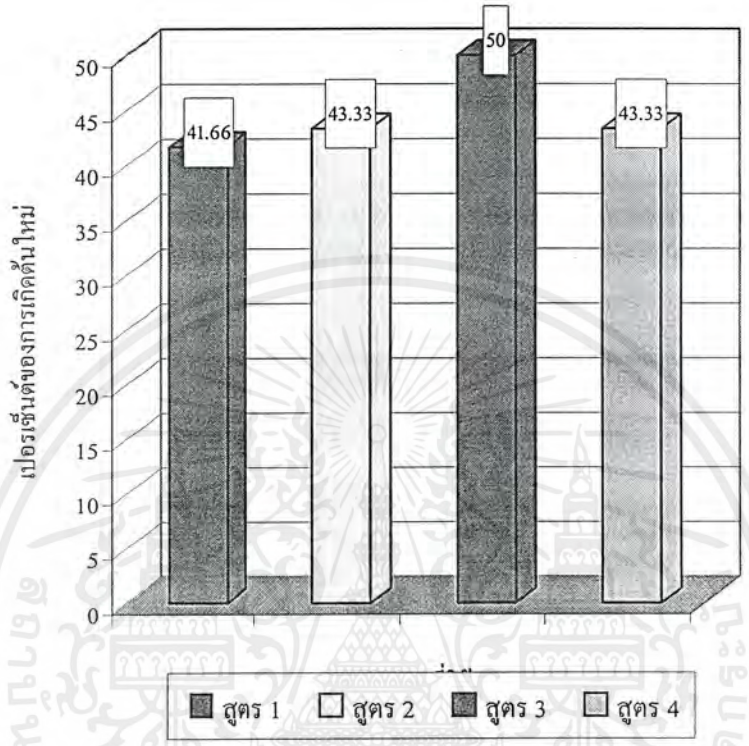
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 3 และ 4 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 4) พบว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 4



รูปที่ 4 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ด้วยอาหารแข็ง NB สูตรที่ 3 และสูตรที่ 4

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นของอาหารทั้ง 4 สูตร มาทำการเปรียบเทียบ (รูปที่ 5) จากกราฟจะเห็นว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ 50.55 เปอร์เซ็นต์ รองมาคืออาหารสูตรที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 43.33 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเท่ากับอาหารสูตรที่ 4 ส่วนอาหารสูตรที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นต่ำที่สุด คือ 41.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณซีเอติน และไฟทาเจลที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารแข็งสูตร NBที่แตกต่างกัน 4 สูตร ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 1 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 26.67 60.00 40.22 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 40.05 (ตารางที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	4	26.67
15	9	60.00
15	6	40.22
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		40.05

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 2 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 33.33 53.33 40.00 และ 46.66 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 43.33 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (SP 60) ในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

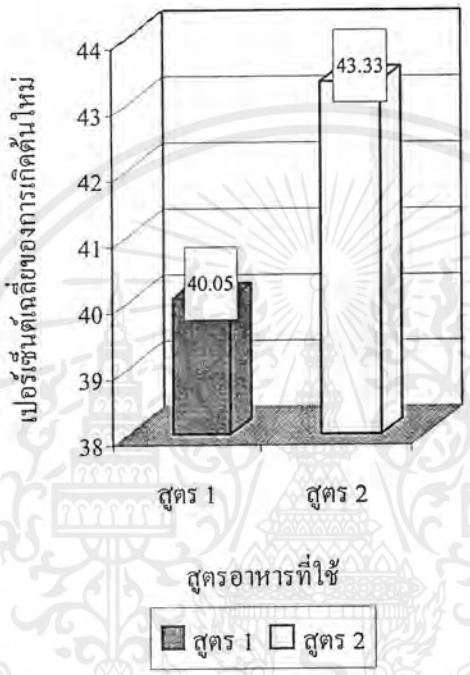
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	4	26.67
15	9	60.00
15	6	40.22
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		40.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 1 และ 2 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 6) พบว่าอาหารสูตรที่ 2 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 1



รูปที่ 6 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ด้วยอาหารแข็ง NB สูตรที่ 1และสูตรที่ 2

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 3 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 66.66 53.33 73.33 และ 53.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 61.66 (ตารางที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตร 3 ที่มีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	10	66.67
15	8	53.33
15	11	73.33
15	8	53.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		61.66

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 4 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 26.67 53.33 33.33 และ 46.66 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 39.99 (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 60 ในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

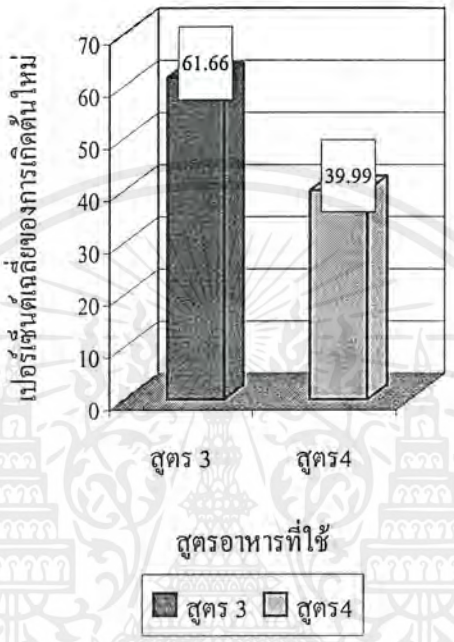
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	4	26.67
15	8	53.33
15	5	33.33
15	7	46.66
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		39.99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

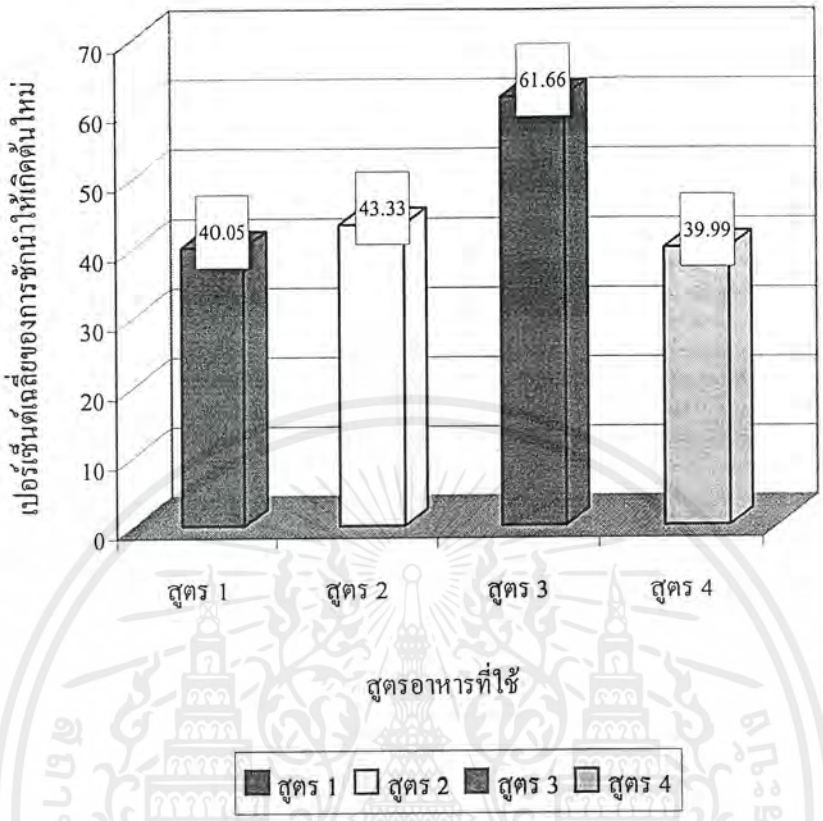
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 3 และ 4 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 7) พบว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 4



รูปที่ 7 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ด้วยอาหารแข็ง NB สูตรที่ 3 และสูตรที่ 4

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นของอาหารทั้ง 4 สูตร มาทำการเปรียบเทียบ (รูปที่ 8) จากกราฟจะเห็นว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ 61.66 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือ อาหารสูตรที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 43.33 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตรที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 40.05 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ 4 ที่มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 39.99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของปริมาณซีเอตินและไฟทาเจล ที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารแข็งสูตร NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์กข 6 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 1 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 46.67 20.0 67.67 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 41.91 (ตารางที่ 11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	3	20.00
15	10	67.67
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		41.91

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์กข 6 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 2 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 60.00 33.33 73.33 และ 53.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 54.99 (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

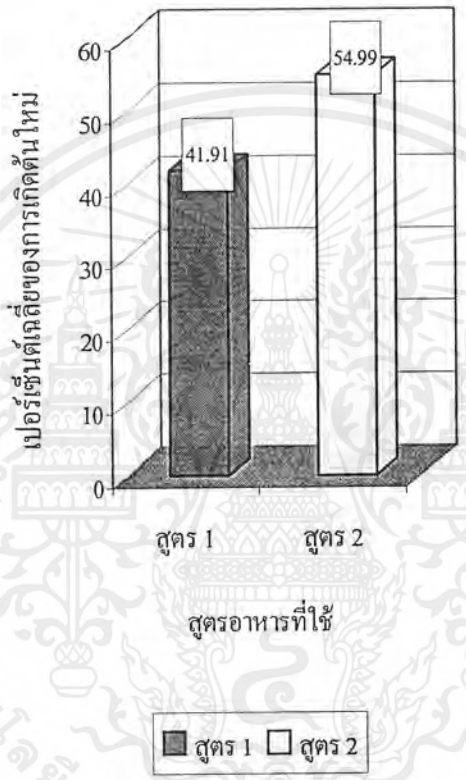
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	3	20.00
15	10	67.67
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		41.91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 1 และ 2 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 9) พบว่าอาหารสูตรที่ 2 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 1



รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวพันธุ์ กข6 ด้วยอาหารแข็ง NB สูตรที่ 1และสูตรที่2

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 3 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 46.67 80.00 60.00 และ 53.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 60.00 (ตารางที่ 13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ในอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	12	80.00
15	9	60.00
15	8	53.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		60.00

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์กข 6 ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 4 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 33.33 46.67 53.33 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 41.66 (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

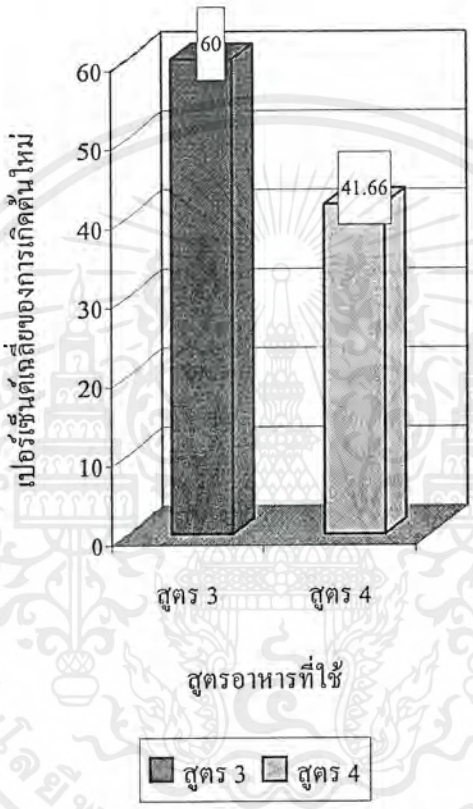
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	12	80.00
15	9	60.00
15	8	53.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		60.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

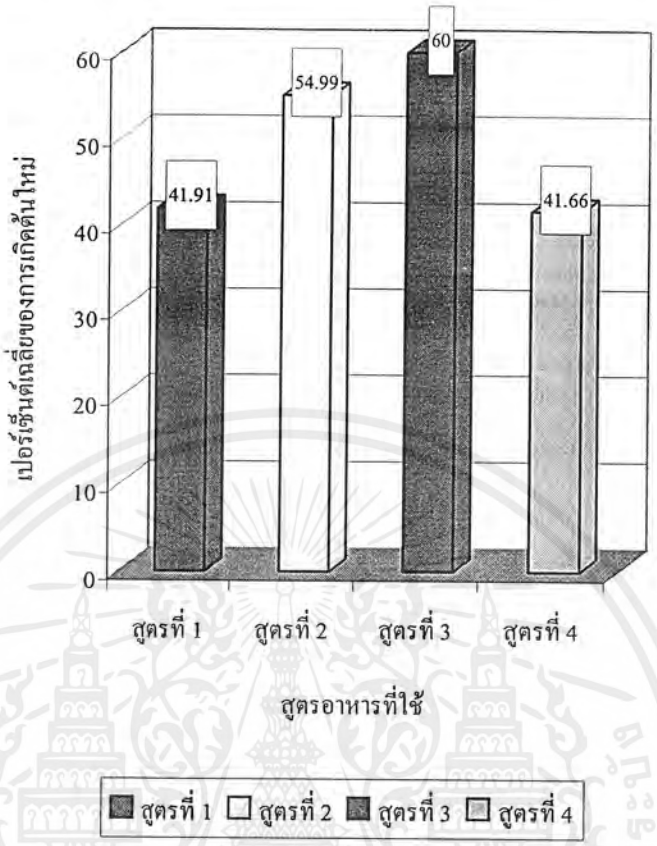
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 3 และ 4 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 10) พบว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 4



รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นในข้าวพันธุ์ กข 6 ด้วยอาหารแข็ง NB สูตร 3และ4

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นของอาหารทั้ง 4 สูตร มาทำการเปรียบเทียบ (รูปที่ 11) จากกราฟจะเห็นว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ 60.00 เปอร์เซ็นต์ รองมาคืออาหารสูตรที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 54.99 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตรที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 41.99 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ 4 ที่มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 41.66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของอาหารแข็ง NB 4 สูตร ในข้าวพันธุ์ กข 6

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้น สูตรที่ 1 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 20.00 33.33 26.67 และ 46.64 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 31.66 (ตารางที่ 15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	3	20.00
15	5	33.33
15	4	26.67
15	7	46.64
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		31.66

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 2 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 46.67 40.00 26.67 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 36.66 (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

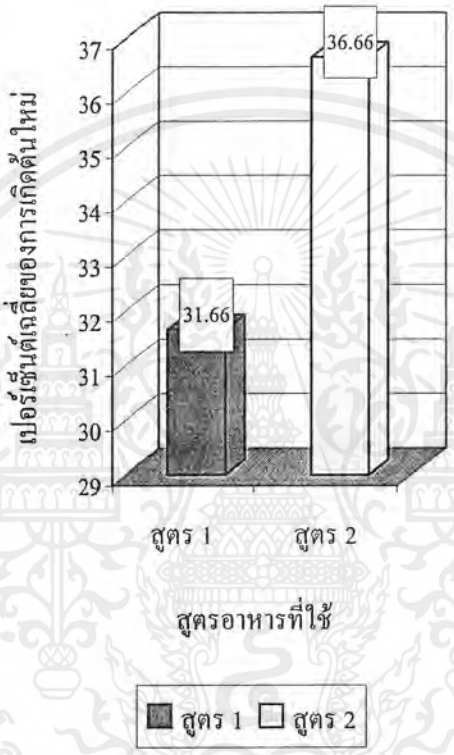
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	6	40.00
15	4	26.67
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		36.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 1 และ 2 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 12) พบว่าอาหารสูตรที่ 2 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 1



รูปที่ 12 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวพันธุ์ชัยนาท ด้วยอาหารแข็ง NB สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 3 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 53.33 33.33 60.00 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 44.99 (ตารางที่ 17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	8	53.33
15	5	33.33
15	9	60.00
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		44.99

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นสูตรที่ 4 โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 4 ซ้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ คือ 46.67 13.33 26.67 และ 33.33 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย คือ 30.00 (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 แสดงเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมีปริมาณสารดังนี้

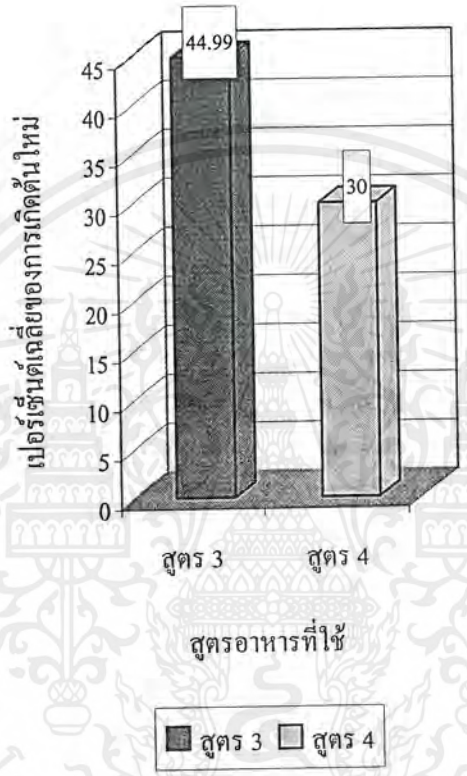
BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	การเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
15	7	46.67
15	2	13.33
15	4	26.67
15	5	33.33
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้น		30.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

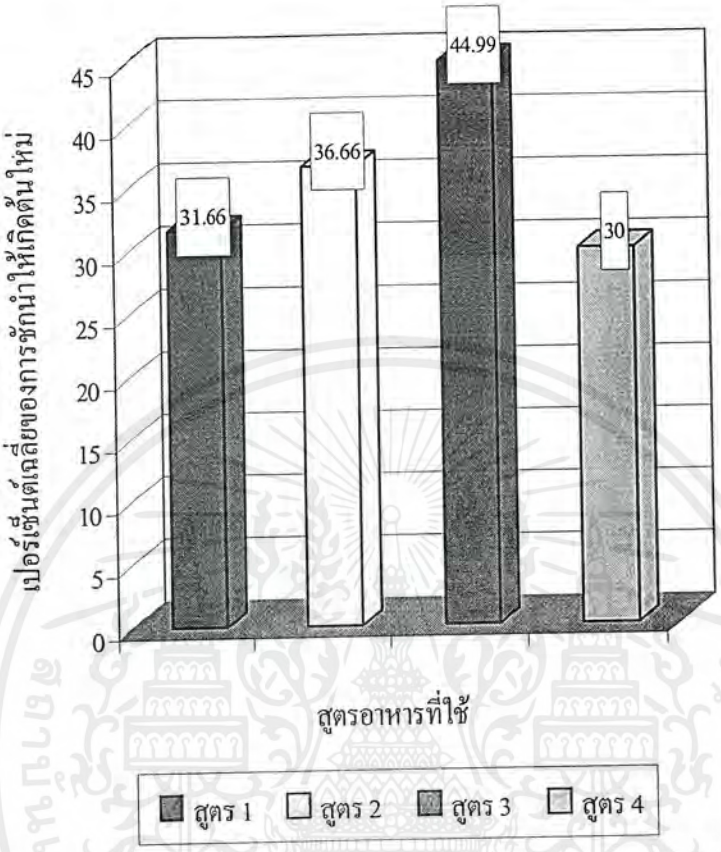
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของข้าวบนอาหารแข็งสูตรที่ 3 และ 4 มาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 13) พบว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 4



รูปที่ 13 กราฟแสดงผลการชักนำให้เกิดต้นของอาหารแข็ง NB สูตรที่ 3และสูตรที่ 4 ในข้าวพันธุ์ชัยนาท

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นของอาหารทั้ง 4 สูตร มาทำการเปรียบเทียบ (รูปที่ 14) จากกราฟจะเห็นว่าอาหารสูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ 49.99 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือ อาหารสูตรที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 36.66 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตรที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 31.66 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ 4 ที่มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้น 30.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ ในข้าวพันธุ์ชัยนาท ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของอาหารแข็ง NB ทั้ง 4 สูตร

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ของการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าว 4 พันธุ์ในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นทั้ง 4 สูตร พบว่าอาหารแข็ง NB สูตรที่ 3 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้สูงที่สุดทั้งในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ขาวดอกมะลิ กข 6 และชัยนาท รองลงมาคือ อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ทั้ง 4 พันธุ์

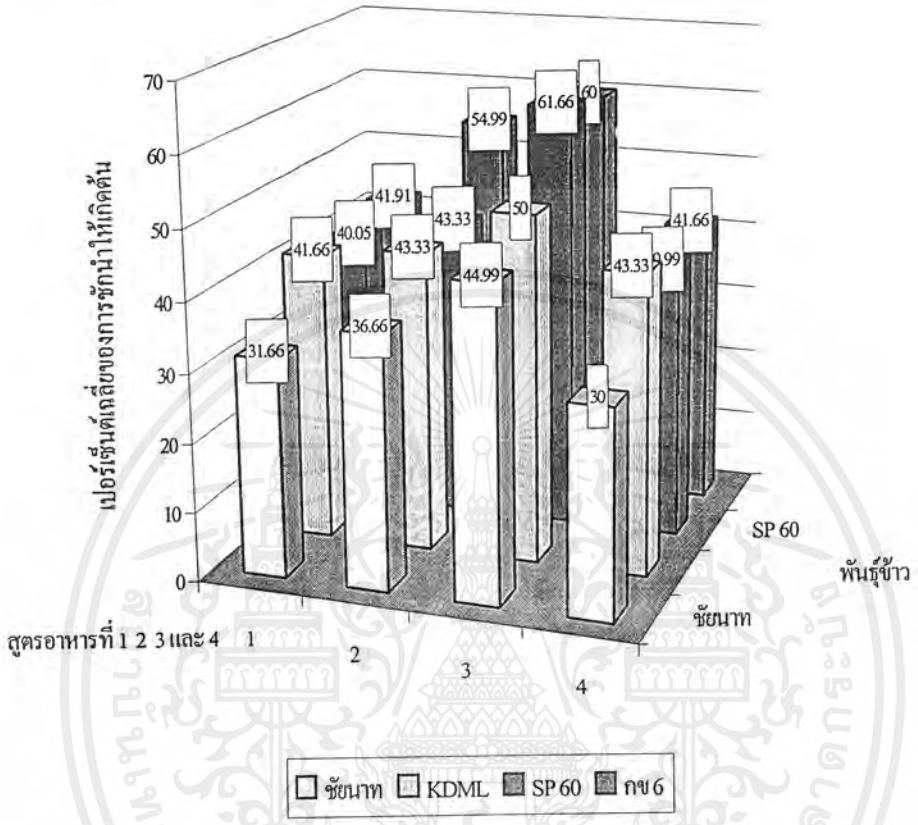
ในข้าวพันธุ์ชัยนาท อาหารสูตรที่ 1และ 4 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ต่ำกว่า อาหารสูตรที่ 3 และ 2 ตามลำดับ

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 นั้น อาหารสูตรที่ 1และ 4 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ต่ำกว่า อาหารสูตรที่ 3 และ 2 ตามลำดับ

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ พบว่าอาหารสูตรที่ 2 และ 4 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้เท่ากัน โดยที่อาหารสูตรที่ 1 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นได้ต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 2 3 และ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนในข้าวพันธุ์กข 6 อาหารสูตรที่ 1 และ 4 มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ต่ำกว่าอาหารสูตรที่ 3 และ 2 ตามลำดับ

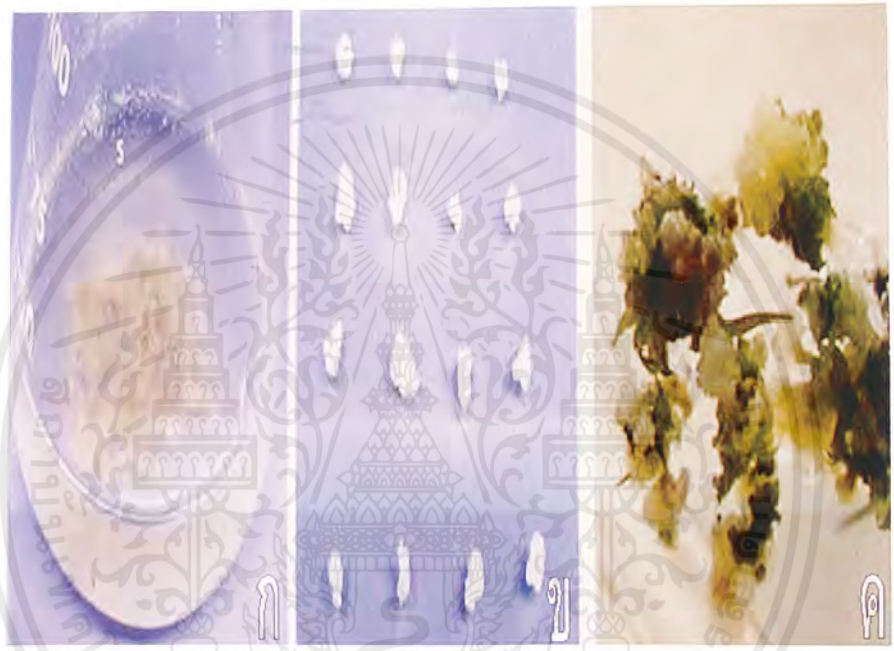


รูปที่ 15 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าว 4 สายพันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ105 สุพรรณบุรี 60 กข6 และชัยนาท โดยใช้อาหารแข็ง NB ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ดังนี้

1.	BAP	3.0	มิลลิกรัมต่อลิตร	NAA 0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	2.6	กรัมต่อลิตร	ซีเอติน 0.50	มิลลิกรัมต่อลิตร
2.	BAP	3.0	มิลลิกรัมต่อลิตร	NAA 0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	2.6	กรัมต่อลิตร	ซีเอติน 1.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
3.	BAP	3.0	มิลลิกรัมต่อลิตร	NAA 0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	5.2	กรัมต่อลิตร	ซีเอติน 0.50	มิลลิกรัมต่อลิตร
4.	BAP	3.0	มิลลิกรัมต่อลิตร	NAA 0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไฟทาเจล	5.2	กรัมต่อลิตร	ซีเอติน 1.00	มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง เมื่อเซลล์แขวนลอยของข้าวถูกนำมาวางบนอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่เหมาะสม เซลล์แขวนลอยจะเริ่มมีการเจริญเป็นแคลลัส และจะมีการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ต่อไป (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 แสดงการชักนำให้เกิดต้นใหม่
ก. เซลล์แขวนลอยที่นำมาชักนำให้เกิดต้นใหม่
ข. นำไมโครแคลลัสวางลงบนอาหารเหลว
ค. ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่

3. ความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์

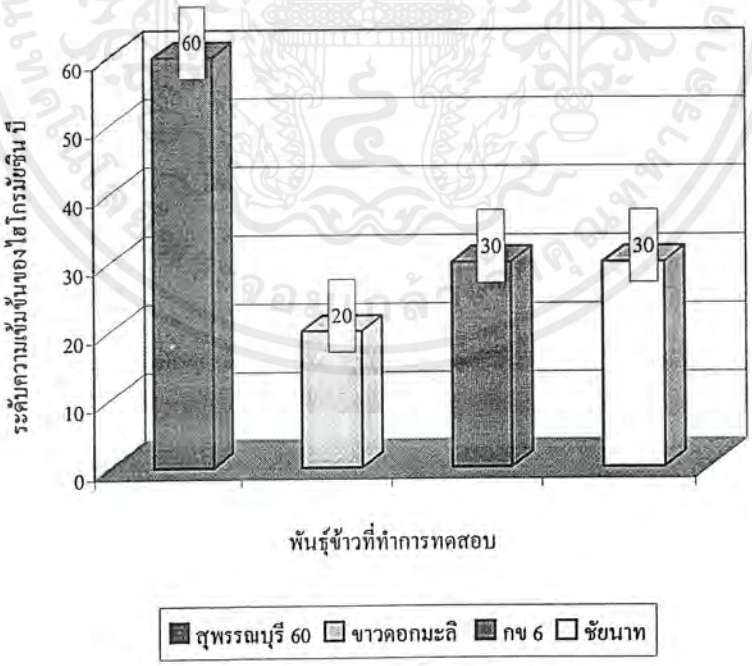
ทำการทดสอบกับเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ สุพรรณบุรี 60 ชัยนาท และกข 6 (ตารางที่ 19) พบว่าความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน บี สูงสุดที่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ สามารถทนได้ คือ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน บี สูงสุดที่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 และข้าวพันธุ์ชัยนาท สามารถทนได้ คือ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน บี สูงสุดที่ข้าวพันธุ์ กข 6 สามารถทนได้ คือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 แสดงผลของการทดสอบความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 สายพันธุ์ คือ สุพรรณบุรี 60 ขาวดอกมะลิ กข 6 และชัยนาท

สายพันธุ์ของเซลล์แขวนลอยของข้าวที่ทำการทดสอบ	ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน บี ที่สามารถต้านทานได้
ขาวดอกมะลิ	60
สุพรรณบุรี 60	30
ชัยนาท	30
กข 6	20

เมื่อนำระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน บี สูงสุดที่ข้าวทั้ง 4 พันธุ์สามารถทนได้มาทำการเปรียบเทียบ (รูปที่ 17) พบว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ สามารถทนได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด รองมาคือพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ซึ่งสามารถทนได้ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับพันธุ์ชัยนาท และพันธุ์ กข 6 มีระดับความเข้มข้นที่สามารถทนได้ต่ำที่สุด



รูปที่ 17 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของเซลล์แขวนลอยในข้าว 4 พันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองนี้ จะคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของข้าวที่มีลักษณะสมบูรณ์ (รูปที่ 18 ก) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน บี ที่แตกต่างกัน โดยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ข้าวแต่ละพันธุ์สามารถทนได้นั้น ลักษณะของเซลล์จะดำคล้ำ และตายในที่สุด (รูปที่ 18 ข)

รูปที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน บี ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตรกับลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซิน บี ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้เซลล์แขวนลอยของข้าวหยุดการเจริญ

ก. ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงบนอาหารที่มี ไฮโกรมัยซิน บี ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงบนอาหารที่มี ไฮโกรมัยซิน บี ที่ความเข้มข้นสูงสุด ที่ทำให้ไมโครแคลลัสหยุดการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การย้ายยีน

ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์ คือ สุพรรณบุรี 60 ขาวดอกมะลิ กข 6 และชัยนาทที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4.1 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของพันธุ์ สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ได้จากการสังเกตผ่านกล้องสเตอริโอมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน (ตารางที่ 20) พบว่าสายพันธุ์ AGL-1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 20 สายพันธุ์ EHA 105 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 60 และสายพันธุ์ LBA 4404 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 50

ตารางที่ 20 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการย้ายยีน	ผลของการย้ายยีนโดยดูจากกล้องสเตอริโอ						เปอร์เซ็นต์ในการย้ายยีน
	0	1	2	3	4	รวม	
AGL-1	8	0	2	0	0	10	20%
EHA 105	4	4	1	1	0	10	60%
LBA 4404	5	3	2	0	0	10	50%

หมายเหตุ การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

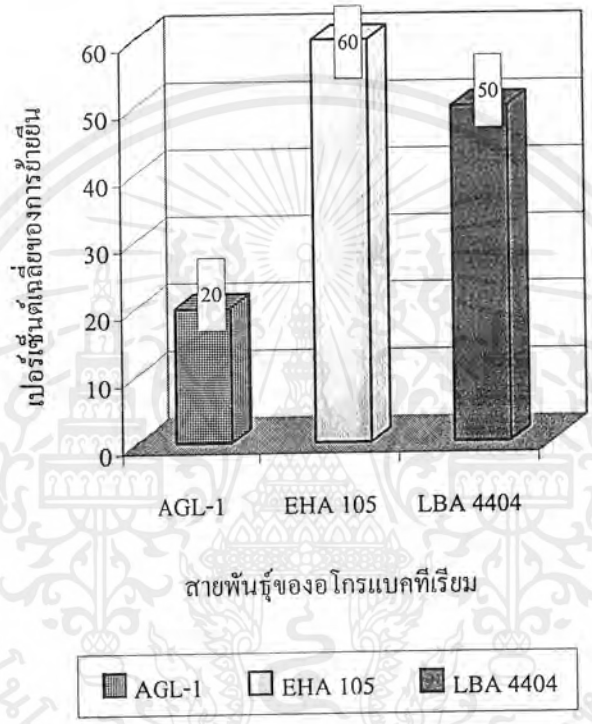
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 มาทำการเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 19) จะเห็นได้ว่าเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ได้สูงสุด เมื่อเทียบกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 และ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส



รูปที่ 19 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1และLBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่ได้จากการสังเกตผ่านกล้องสเตอริโอมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน (ตารางที่ 21) พบว่าสายพันธุ์ AGL-1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 30 สายพันธุ์ EHA 105 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 20 และสายพันธุ์ LBA 4404 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 0

ตารางที่ 21 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการย้ายยีน	ผลของการย้ายยีนโดยดูจากกล้องสเตอริโอ						เปอร์เซ็นต์ในการย้ายยีน
	0	1	2	3	4	รวม	
AGL-1	7	0	3	0	0	10	30%
EHA 105	8	1	1	0	0	10	20%
LBA 4404	10	0	0	0	0	10	0%

หมายเหตุ การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

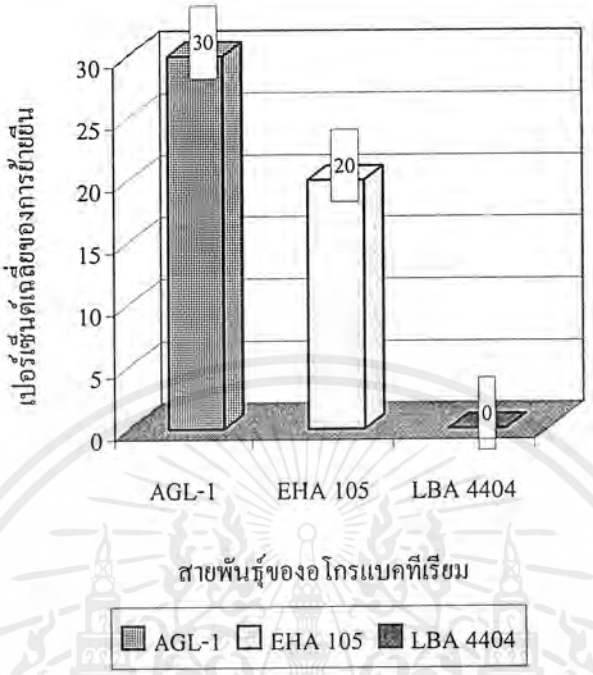
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ มาทำการเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 20) จะเห็นได้ว่า เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 และ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4.3 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ได้จากการสังเกตผ่านกล้องสเตอริโอมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน (ตารางที่ 22) พบว่าสายพันธุ์ AGL-1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 10 สายพันธุ์ EHA 105 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 20 และสายพันธุ์ LBA 4404 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการย้ายยีน	ผลของการย้ายยีนโดยดูจากกล้องสเตอริโอ						เปอร์เซ็นต์ในการย้ายยีน
	0	1	2	3	4	รวม	
AGL-1	9	0	1	0	0	10	10%
EHA 105	8	0	2	0	0	10	20%
LBA 4404	10	0	0	0	0	10	0%

หมายเหตุ การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

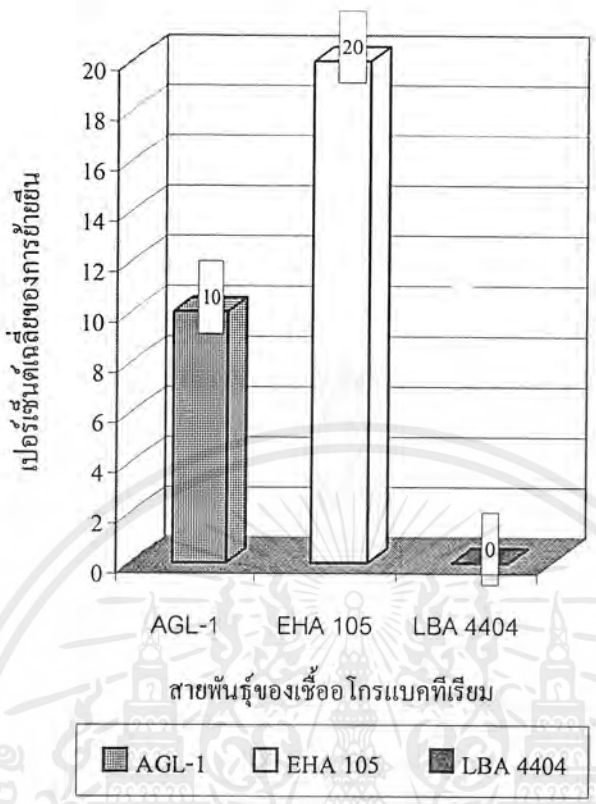
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 มาทำการเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 21) จะเห็นได้ว่า เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 และ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในข้าวพันธุ์ชัยนาท ที่ได้จากการสังเกตผ่านกล้องสเตอริโอมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน (ตารางที่ 23) พบว่าสายพันธุ์ AGL-1 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 0 สายพันธุ์ EHA 105 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 40 และสายพันธุ์ LBA 4404 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยในการย้ายยีน คือ 30

ตารางที่ 23 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการย้ายยีน	ผลของการย้ายยีนโดยดูจากกล้องสเตอริโอ						เปอร์เซ็นต์ในการย้ายยีน
	0	1	2	3	4	รวม	
AGL-1	10	0	0	0	0	10	0%
EHA 105	6	0	4	0	0	10	40%
LBA 4404	7	1	2	0	0	10	30%

หมายเหตุ การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอ เป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

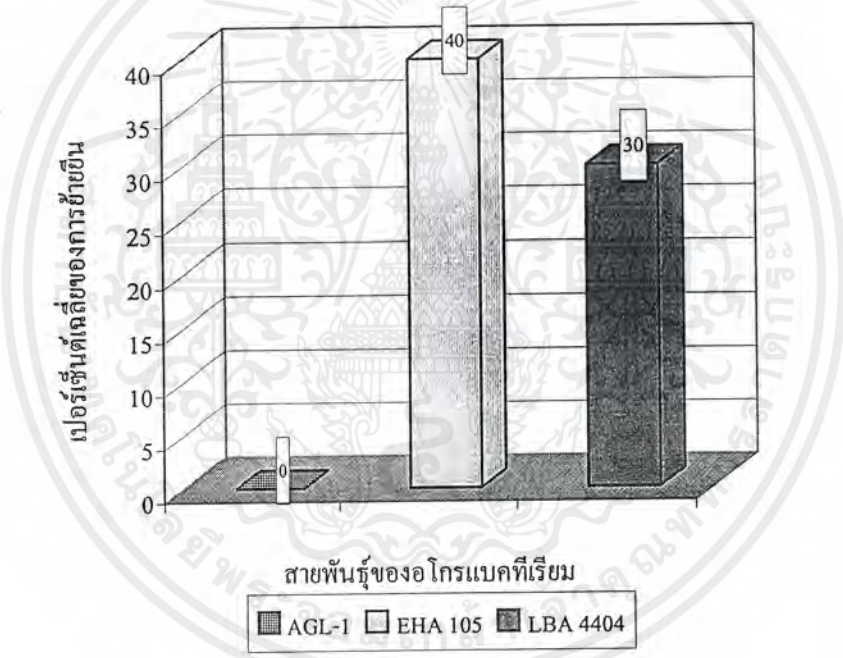
2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน

4 = สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนมากกว่าที่ระดับ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

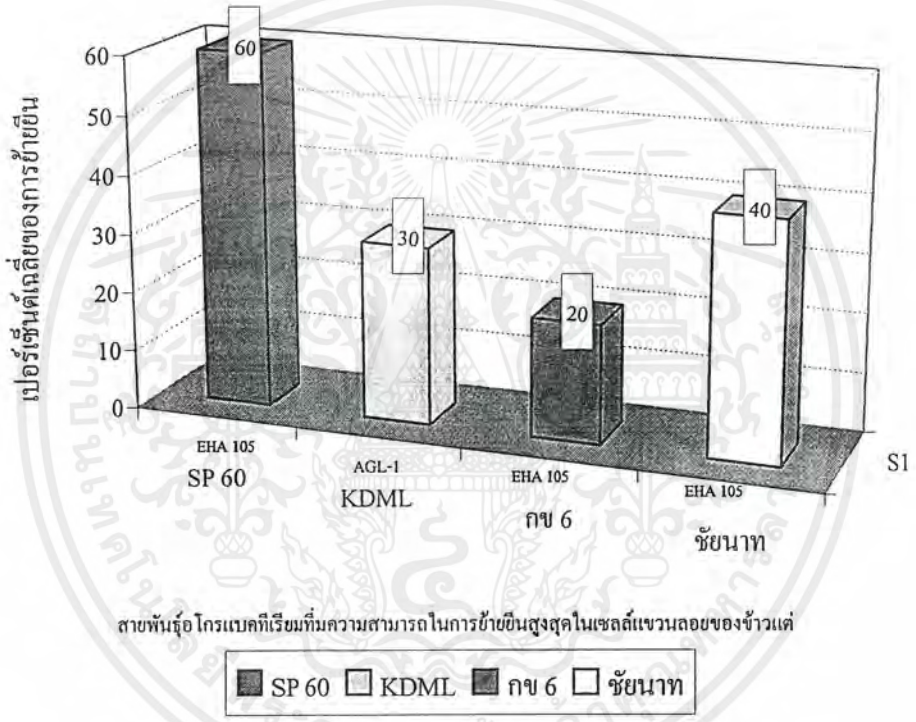
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการย้ายยีนด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท มาทำการเปรียบเทียบกัน(รูปที่ 22) จะเห็นได้ว่า เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ชัยนาท ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 และ LBA 4404 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส



รูปที่ 22 แสดงผลของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ ชัยนาท ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

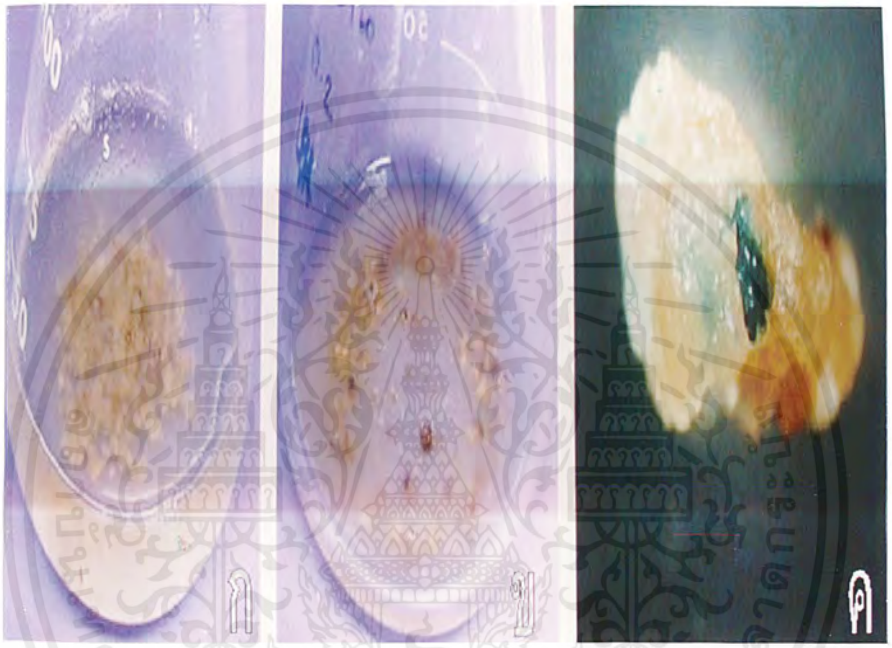
เมื่อนำเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์มาทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้ายยีน (รูปที่ 23) พบว่าเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุดเมื่อใช้ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 กข 6 และชัยนาท ส่วนในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ พบว่าเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนที่สูงที่สุด



รูปที่ 23 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้ายยีนด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ของข้าวพันธุ์ SP 60 KDML กข 6 และ ชัยนาทที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนของการย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวนั้นเริ่มจาก คัดเลือกเซลล์แขวนลอย (รูปที่ 24 ก) จากนั้นจึงเลี้ยงอโกรแบคทีเรียมบนเซลล์แขวนลอยของข้าว (รูปที่ 24 ข)แล้วจึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนผ่านกล้องสเตอริโอ (รูปที่ 24 ค)



รูปที่ 24 แสดงการถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าว
ก. เซลล์แขวนลอยที่จะนำมาทำการย้ายยีน
ข. การเจริญของอโกรแบคทีเรียมบนเซลล์แขวนลอย
ค. การแสดงออกของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัส

ในการทดลองการชักนำเอ็มบริโอแก่ในอาหารแข็งสูตร NB ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA แตกต่างกัน 2 ค่า คือ 0.5 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารแข็งสูตร NBที่มี ฮอร์โมน NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำเอ็มบริโอแก่ให้กลายเป็นแคลลัสได้ดีกว่าอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดต้นใหม่ในข้าว 4 พันธุ์

ผลของซีเอติน และไฟทาเจลในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 3 ประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่มีค่าเท่ากับอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีความสามารถการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ต่ำที่สุด

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงที่สุด รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวพันธุ์ กข 6 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงที่สุด รองลงมาคือสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ข้าวพันธุ์ชัยนาทที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงที่สุดรองลงมาคือสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซีเอติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

3. การศึกษาความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ของเซลล์แขวนลอย

ความสามารถในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ที่มีในอาหารแข็งสูตร NB พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความสามารถในการต้านทานที่แตกต่างกันดังนี้

ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิจะมีความสามารถสูงสุดในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ได้ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 และชัยนาทพบว่าทั้ง 2 พันธุ์มีความสามารถสูงสุดในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ได้ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในข้าวพันธุ์ กข 6 มีความสามารถสูงสุดในการต้านทานไฮโกรมัยซิน บี ได้ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาผลของการย้ายยีน

การย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ในเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 สายพันธุ์ การนำอโกรแบคทีเรียมมาใช้เป็นพาหะในการย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 สายพันธุ์คือ ขาวดอกมะลิ ชัยนาท กข 6 และสุพรรณบุรี 60 พบว่าผลของการย้ายยีนจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ข้าว และสายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม

ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ทำการย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 จะมีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุด รองลงมาคือ การย้ายยีนด้วยอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 และAGL-1 ตามลำดับ

ในข้าวพันธุ์ชัยนาทนั้นอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 จะให้ประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุด รองลงมาคือ สายพันธุ์ LBA 4404 ส่วนในสายพันธุ์ AGL-1 นั้นไม่แสดงผลของการย้ายยีน

ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ พบว่าเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL-1 มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุด รองลงมาคือ สายพันธุ์ EHA105และไม่แสดงผลของการย้ายยีนในการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404

ส่วนในข้าวพันธุ์ กข 6 พบว่าเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนสูงสุด รองลงมาคือสายพันธุ์ AGL-1 ส่วนในสายพันธุ์ LBA 4404 นั้นไม่แสดงผลของการย้ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

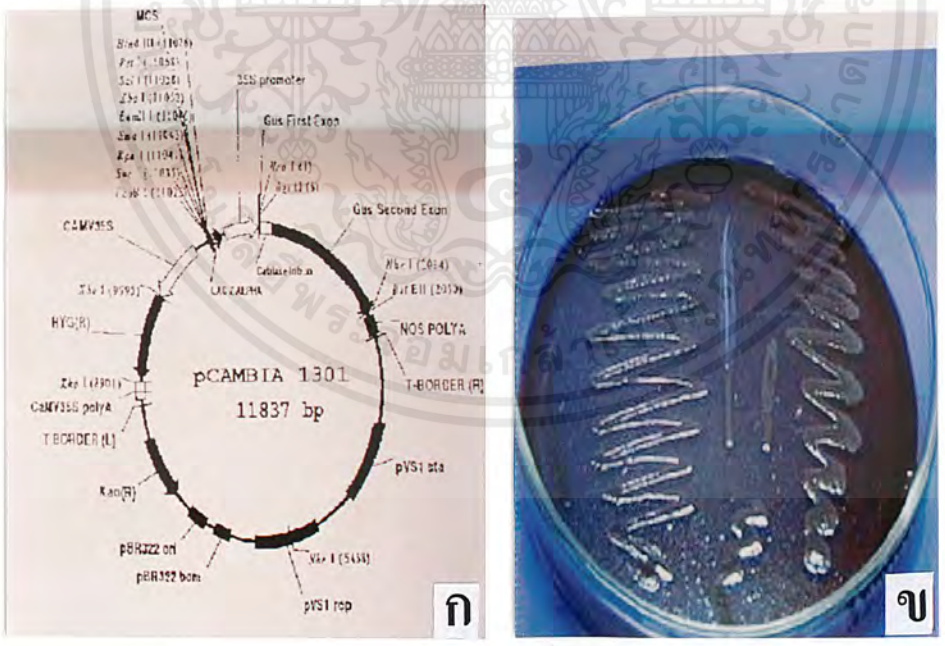
ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 วิธีทดสอบกัสแอสเส (GUS Assay)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนกัสในเซลล์แขวนลอยข้าว ทำโดยนำเซลล์แขวนลอยของข้าวมาแช่ในสารละลายเอ็กซ์กลัก แล้วจึงนำไปใส่ในตู้บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกไป แล้วทำการบันทึกผลโดยบันทึกจำนวนเซลล์แขวนลอยที่เปลี่ยนเป็นสีฟ้า

สารละลายเอ็กซ์กลักประกอบด้วย

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



ภาคผนวกรูปที่ 1 ก. พลาสมิด pCAMBIA 1301
ข. เชื้ออโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2แสดงสูตรอาหารแข็งสูตร NB

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
สารละลาย D	KNO_3	2830
	$(NH_4)_2SO_4$	463
สารละลาย E	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	166
สารละลาย F	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185
	KH_2PO_4	460
B5 micronutrients	KI	0.75
	H_3BO_3	3
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
	$Na_2Mo_4 \cdot 7H_2O$	0.25
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
FeEDTA	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.8
B5Vitamins	Inositol	100
	Nicotinic acid	1
	Pyridoxine HCl	1
	Thiamine HCl	10
	Casien hydrolysate	100
	L-Proline	1000
	Sucrose	30 กรัมต่อลิตร
	Phytagel	2.6 กรัมต่อลิตร
	pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3สารเคมีในอาหารสูตร N_6 (Chu Medium) 1966

	สารเคมี	ความเข้มข้น(มิลลิกรัมต่อลิตร)
I	$(NH_4)_2SO_4$	463
	KNO_3	2830
	KH_2PO_4	400
	MgSO47H2O	185
II	$CaCl_2.2H_2O$	166
III	$MnSO_4.H_2O$	3.33
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.50
	H3BO3	1.60
	KI	0.8
IV	Na_2EDTA	37.30
	$FeSO_4.7H_2O$	27.80
V	Glycine	2.0
	Thiamine-HCI	1.00
	Pyridocxine-HCI	0.50
	Nicotinic acid	0.50

L-proline	0.69	g/l
Casein hydrolysate	0.10	g/l
Sucrose	20	g/l
Phytagel	2.6	g/l
pH 5.8		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา.หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.2524:133 หน้า.

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

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

วันชัย ตันติวิทยาพิทักษ์.ข้าว รสชาติ เมล็ดพันธุ์และการเดินทางของข้าวไทย. นิตยสารสารคดี 163(2541) : 114-132.

สนธิชัย จันทร์เปรม,ชัยกฤษ มณีพงษ์ และอรดี สหวัชรินทร์. การคัดข้าวทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร,.ในรายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 23 สาขาพืช.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน,กรุงเทพฯ (2528):1-10.

สุพรรณี แก่นสาน.ผลของรังสีแกมม่าต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนในข้าว.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ. (2532)

อรดี สหวัชรินทร์.เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.29 หน้า.อักษรสยามการพิมพ์.2539.

อุดม นวพานิชย์ และอรดี สหวัชรินทร์. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว.วิทยาสารเกษตรศาสตร์ ปีที่ 14 (2):17-18.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 (2539) 70-79 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย ของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 37, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37.(2542) 230-236 น.

Bhattacharjee,B.,Gynheung An and Gupta,H.S. Fertile indica rice produced by expression of mize ubiquitin promoter-bar chimaeric gene the protoplasts. J. Plant Biochem. Biotechnol ,6(1997) : 69-73.

Bhattacharjee,B.,Pattanayak,A.,and Gupta,H.S., Fertile plant regeneration from suspension culture-derived protoplasts of two indica rice lines and field evaluation of the seed progeny. J.Genet. & Breed.53(1998) : 135-141.

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

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

Chen L.,Zhang S.,Beachy R.N.,Fauquet C.M. A protocol for consistent , large-scale production of fertile transgenic rice plants. Plant Cell Reports.18(1998):25-31.

Chowdhry, C.N., Tyagi, A.K., Maheshwari, N. and Mahesh wari, S.C. Effect of L-Proline and Tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice(*Oryza sativa* L.). Plant Cell Tissue Org. Cult. 32(1993) : 357-361.

Chu ,C.C., C.S., Wang, C.S.Sun, C.Hsu, K.C.Yin, C.Y.Chy and F.Y.Bi. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice though comparative experiments on the nitrogen sources. Sci.Sinica. 18(1975) : 659-668.

Cornejo-Martin, M.J.and E. Primo-Millo. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.) . Euphytica. 30(1989) : 205-214.

Datta ,K., Potrykus, I. And Datta.,S.K. Efficient fertile plant regeneration form protoplasts of the indica rice breeding line IR-72 (*Oryza sativa* L.).Plant Cell Reports.11(1992):229-233.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ella, E. S. and F.J. Zapata. Suspension initiation in indica rice requires proline. IRRN.Vol 18:1 (1993) : 17-18.

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

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

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

Henke, R.R., Mansur M.A. and Constaintin M.J. Organogenesis and plantlet formation form organ and seeding derived calli of rice (*Oryza sativa*). Plant Physiol. 44 (1978):11-14.

Herry S.Utomo,Suzan S.Croughan and Timothy P.Croughan.Suspension and protoplast culture of U.S. rice cultivars. Plant Cell Reports.15(1995):34-37.

Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol 35 : 205-218.

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

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

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

Nicola M.Ayres and Willium D.Park.Genetic Transformation of Rice . Plant Sciences.13 (1994):219-239.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paul Christou,Tmeria L. Ford and Matt Kofron. Production of transgenic rice *Oryza sativa* Plant from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technology.9(1991):957-962.

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

Poeaim, A., N. Sangduen, S.Pongchareankit, W, Boonmee and W. Kaewbunsong. Growth curve of KHAO-DAWK-MALI 105 rice (*Oryza sativa* L .) Suspension. Culture. p204.abstract In International conference on Biotechnology Research and Application for Sustainable in Development. Chulabhorn Research Institute, (BRASD) August 7-10, (1995). Bangkok. Thailand.

Poeaim, A., and N. Sangduen. Protoplast Isolation and Culture from Cell Suspension Culture by using KHAO-DAWK-MALI 105 Rice Callus (*Oryza sativa* L.). p 115. abstracts of the Third Asia - Pacific Conference on Agricultural Biotechnology : Issues and Choices. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA) .November 10-15. (1996). Prachuapkhirikhan, Thailand.

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

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

Shipins Zhans,Lili Chen,Rongda Qu,Philippe Marmeu,Roger Beachy,and Claude Fauquet.Regenerate of fertile transgenic indica (grop 1) rice plant following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. Plant Cell Reports.15(1996):465-469.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้