สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย้ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

T035858

นาย ประสิทธิ ศรีอริยะวงศ์

นาย พงศธร กิมเฮง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35858
วัน, เดือน, ปี 7 มิ.ย. 2543

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gene Transformation in Maize (*Zea may L.*)

by *Agrobacterium tumefaciens*

Mr. Prasit Sriariyawong

Mr. Pongsathorn Kimheng

A special Project submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mohgkut's Institute of Technology Ladkrabang

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การย้ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

Gene Transformation in Maize (*Zea may L.*) by *Agrobacterium tumefaciens*

โดย นายประสิทธิ ศรีอริยะวงศ์ รหัสประจำตัว 39054327

นายพงศธร กิมเฮง รหัสประจำตัว 39054331

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาค

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานคณะกรรมการ

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

..... กรรมการ

(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

..... กรรมการ

(อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การย้ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*
โดย นาย ประสิทธิ ศรีอริยะวงศ์ รหัสประจำตัว 39054327
นาย พงศธร กิมเฮง รหัสประจำตัว 39054331
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 พบว่าสูตรที่ทำให้เกิดการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4 D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวโพดในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญไปเป็นต้นได้ดีที่สุด

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

การศึกษาปัจจัยการย้ายยีน พบว่าอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL-1 และ EHA 105 เอ็มบริโออายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยอะซิโตไซลิงโกน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จะมีเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title Gene Transformation in Maize (*Zea may L.*) by *Agrobacterium tumefaciens*

Name Mr. Prasit Sriaryawong code 39054327

Mr. Pongsathorn Kimheng code 39054331

Department Applied Biology

Special Project Advisor Anurug Poeaim

Academic year 1999

Abstract

Immature embryos culture of INSEE 2 were cultured on solid N_6 medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D , 0.69 g/l L-proline, 0.1 g/l casein hydrolysate, 2 % sucrose and 2.6 g/l phytagel and NAA 0.5 mg/l , which induce numerous calli.

Callus were transferred to culture on solid N_6 medium supplemented with 0.69 g/l L-proline, 0.1 g/l casein hydrolysate, 2 % sucrose, 5.2 g/l phytagel , 0.1 mg/l NAA and 1 mg/l zeatin , which induced plantlets.

Embryos for 1 day and callus for 7 days were culture on N_6 medium complemented with 10 , 20, 30, 40 and 50 mg/l of hygromycin B. Embryo for 1 day and callus for 7 days can't developed at 30 and 40 mg/l hygromycin B respectively.

Using *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 and EHA105, 5 days - embryos, on solid N_6 medium supplemented with 100 mg acetosyringone and temperature 25 C° were the best condition transform.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการ อาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการ และอาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัยและช่วยตรวจแก้โครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดระยะเวลาปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ

เมษายน 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1. บทนำ	1
- ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2. ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3. วิธีการทดลอง	18
บทที่ 4. ผลการทดลอง	25
บทที่ 5. สรุปผลการทดลอง	39
ภาคผนวก	41
- ภาคผนวกที่ 1.	41
เอกสารอ้างอิง	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช	14
2.	แสดงตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช	14
3.	แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นไมโครแคลลัส	20
4.	แสดงค่าความเข้มข้นของสารประกอบต่าง ๆ ในอาหารสูตร N_6 ที่ใช้ในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด	20
5.	แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสต่อไฮโกรไมซิน บี	21
6.	แสดงความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนและสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนดขึ้นในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียม ทั้ง 3 สายพันธุ์	23
7.	แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและรากโดยการชักนำของอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย NAA ไฟตาเจล และซีเอติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	26
8.	ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	30
9.	ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	31
10.	ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	32
11.	ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

12. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 34

13. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 35

14. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 36

15. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 37

ตารางภาคผนวกที่ 1. 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	แบบจำลองการยึดเกาะของอโกรแบคทีเรียม	13
2.	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้ออโกรแบคทีเรียมและโครงสร้างของพลาสมิด	24
3.	แสดงลักษณะเอ็มบริโอของข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4 D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	25
4.	แสดงการเจริญของแคลลัสไปเป็นต้นข้าวโพดโดยการชักนำของอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย NAA ไฟตาเจล และซีเอติน	27
5.	แสดงการเกิดเป็นต้นข้าวโพดโดยการชักนำแคลลัส	27
6.	แสดงความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี	28
7.	แสดงขั้นตอนการย้ายยีน	29
8.	แสดงผลของการย้ายยีนโดยตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอและตาเปล่า	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญรองจากข้าวสาลี และข้าว ข้าวโพดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เหมาะสำหรับที่จะนำไปใช้เป็นอาหารของมนุษย์ อาหารสัตว์ และใช้ในขบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆ จากความสำคัญดังกล่าวได้มีการค้นคิดวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีคุณภาพที่ดี มีผลผลิตสูง ทนต่อสภาพแวดล้อม และต้านทานต่อเชื้อโรคต่างๆ โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและพันธุวิศวกรรมมาช่วย ซึ่งจะช่วยลดปัญหาต่าง ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างมาก สำหรับส่วนต่างๆ ของข้าวโพดที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ เอนโดสเปิร์ม ข้อ ปลายราก อับเรณู เรณู เอ็มบริโออ่อน เอ็มบริโออ่อนแก่ เซลล์แขวนลอย และโพรโทพลาสต์ ปัจจุบันงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของข้าวโพดได้เจริญก้าวหน้าไปมาก เช่นมีการย้ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อโดยวิธีที่ใช้กระแสไฟฟ้าเช่น electroporation particle bombardment somatic hybridizer การใช้สารเคมีต่างๆ เช่น และ PEG และการใช้อโกรแบคทีเรียมในย้ายยีน จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า วิธีการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมจะเกิดประโยชน์กับประเทศไทยเป็นอย่างมากคือใช้งบประมาณค่อนข้างต่ำกว่าการย้ายยีนโดยวิธีอื่น ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องหาปัจจัยพื้นฐานต่างๆที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดให้มีประสิทธิภาพที่ดีเสียก่อน ซึ่งในโครงงานพิเศษนี้ใช้อโกรแบคทีเรียมช่วยย้ายยีนให้กับเอ็มบริโอ ชักนำเอ็มบริโอให้เกิดแคลลัส และศึกษาหาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมสำหรับการย้ายยีน และการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่หลังจากการถ่ายโอนยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2

2. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 ให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้

3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 ต่อไฮโกรไมซิน บี

4. การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวโพดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ *Gramineae* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea may* L. มีระบบรากแบบรากฝอย ลำต้นสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ถึง 7.5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 2.5-5 เซนติเมตร ลำต้นมีลักษณะเป็นข้อปล้อง ปล้องที่อยู่ส่วนโคนของลำต้นมีขนาดสั้นกว่าปล้องที่อยู่ถัดไป ฐานของปล้องทุกปล้อง ยกเว้นปล้องสุดท้ายมีตาอยู่ 1 ตา ตาที่อยู่ใกล้ดินเจริญเป็นหน่อส่วนตาที่อยู่เหนือดินเจริญเป็นฝัก

ใบประกอบด้วยกาบใบทำหน้าที่หุ้มตาและลำต้น ใบเป็นแผ่นเรียวยาวประมาณ 80 เซนติเมตร มีเยื่อกันน้ำเป็นแผ่นบางอยู่ตรงรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ หูใบเกิดที่ฐานของใบทั้งสองข้าง ข้าวโพดเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้เกิดจากตายอดของลำต้น ส่วนช่อดอกตัวเมียหรือฝักเกิดจากตาบริเวณซอกใบประมาณข้อที่เจ็ดนับจากใบธงลงมา ตามซอกใบมี prophyllum หุ้มอยู่ prophyllum ต่างจากใบธรรมดาคือมีเส้น 2 เส้น ตาที่เจริญเป็นฝักเมื่อยังอ่อนอยู่เหมือนตาที่เจริญเป็นแขนง แต่ต่อมา prophyllum ของตาฝักจะเจริญต่อไปและเจริญเป็นฝักอ่อน สำหรับก้านฝักจะไม่ยืดตัวทำให้ใบที่เกิดขึ้นมีแต่ก้านใบกลายเป็นเปลือกหุ้มฝัก (กรมวิชาการเกษตร, 2524)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารสำหรับเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารมักมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันตามชื่อผู้คิดค้น เช่น สูตรอาหารของ White เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ สูตรอาหารของ Vacin และ Went เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ สูตรอาหารของ Murashige และ Shoog (MS) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ และสูตร Chu (N_6) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงข้าวสาลี และข้าวโพดอย่างไรก็ตามสูตรอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่มากมายในปัจจุบันเมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

1.2 แร่ธาตุอาหารรอง (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้เช่นกัน ได้แก่ เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานิส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอล (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล พืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

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

2.1 คาร์โบไฮเดรต ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน เป็นสารให้พลังงาน น้ำตาลที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่

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

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

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

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

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

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

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

2.2 วิตามินเป็นอาหารที่สำคัญ เช่น

2.2.1 ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) วิตามิน B_1 สูตรทางเคมี $C_{12}H_{17}\ CIN_4OS.HCl$ เป็นตัวที่สำคัญ ปกติต้องการ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่าง ๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ได้เองและมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นได้ ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้เร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

2.4.1. ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และรวมกันเป็นกลุ่มของแคลลัส ได้แก่

2.4.1.1. พวกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เช่น

- อินโดอะเซติค แอสิด (indol 3-acetic acit = IAA)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_9NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 175.18

2.4.1.2. พวกที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น

- แอลฟา-แนพทาลิน อะเซติค แอสิด (α-napthalene acetic acid = NAA)

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

- 2,4 ไดรคลอโรฟีนอกซี อะเซติค แอสิด (2,4 –dichlorophenoxy acetic acid = 2,4-D)

สูตรทางเคมี $C_8H_6O_3C_{12}$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04

- 2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกซี อะเซติค แอสิด (2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid = 2,4,5-T)

- 3-อินโดลบิวไทริค แอสิด (3-idolbutyric acid = IBA)

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

- พาราคลอโรฟีนอกซีอะเซติค แอสิด (p-chlorophenoxy acetic acid = pCPA)

สูตรทางเคมี $C_8H_7O_3Cl$ น้ำหนักโมเลกุล 186.59

- 2-แนพทอกซี อะเซติค แอสิด (2-naphtoxyacetic = NOA)

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

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

น้ำหนักโมเลกุล 221.04

- ฟีนิล อะเซติค แอสิด (phenylacetic acid = PAA)

- 4-อะมิโน 3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิค แอสิด (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid)

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

- 6-เฟอร์ฟูริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine = kinetine)

สูตรทางเคมี $C_{10}H_9N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 215.21

- 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine = BAP)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

(N-isopentenyl aminopurine = Nip)

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

- ซีเอติน (zeatin) (เกิดในธรรมชาติ)

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

2.4.3. จิบเบอเรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้จะนำมาใช้น้อย หรือใช้ในบางกรณีเท่าที่ใช้กันทั่วไปได้แก่

- จิบเบอเรลลิน แอสิด (gibberellins acid = GA3)

สูตรทางเคมี $C_9H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.37

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

2.6. สารอื่น ๆ เช่น สารอินทรีย์อื่น ๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน มะเขือเทศ มันฝรั่ง กล้วย เป็นต้น บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อยังไม่ทราบแน่ชัด ผงถ่านที่เติบเข้าไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจากเซลล์

ผลของออกซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่ไม่มีเซลลูโลส

2. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก

3. กระตุ้นการเกิดรากของยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิดรากเป็นขั้นตอน ที่ทำให้พืชเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับออกซินในต้นพืชกับสภาพแวดล้อม ถ้าออกซินภายในต้นมีระดับต่ำก็สามารถเพิ่มออกซินให้แก่พืชเพื่อการเกิดรากที่สมบูรณ์

ผลของไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ส่งเสริมการเจริญของใบ

2. ยับยั้งการเจริญของราก

3. กระตุ้นให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดหลายยอด

4. ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์เนื่องจากมีผลต่อ RNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนอันเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์และไซโตพลาสซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของจิบเบอเรลลินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จิบเบอเรลลินสามารถกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ หรือการแบ่งตัวของเซลล์ หรือทั้งการยืดตัวและการแบ่งตัวของเซลล์

การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือราก

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พาเรนไคมาเป็น ยอด ราก ใบหรือดอกนั้น เกิดจาก 2 กระบวนการ คือ

1. Organogenesis คือการเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นโดยการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาใกล้เคียงเป็น meristematic cell ขนาดเล็ก แวคิวโอลเล็กและมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้น มีอัตราแบ่งตัวสูง อาจเรียกได้ว่า Meristemoids ที่สามารถเจริญเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก ได้อย่างอิสระตามแต่จะได้รับการกระตุ้น

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

ไม่ว่าจะผ่าน Organogenesis หรือ Embryogenesis ก็ตาม การเกิด Morphogenesis จะมีการพัฒนาของเซลล์ใน 2ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เจริญและพัฒนาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นจุดกำเนิดยอดหรือรากโดยต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมีในอาหาร อุณหภูมิ และแสงทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง มีแวคิวโอลเล็ก และไซโตพลาสซึมเข้มขึ้น สร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพิ่ม รวมถึงมีการแบ่งตัวเร็วมาก กลุ่มเซลล์นี้จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดยอด ราก หรือ Embryoids

ระยะที่ 2 เมื่อเกิดจุดกำเนิดยอดหรือราก หรือ Embryoids แล้วหลังจากได้รับอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมจะเจริญเป็นต้นและ/หรือ รากที่สมบูรณ์ได้โดย พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์มีดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของจิบเบอเรลลินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จิบเบอเรลลินสามารถกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ หรือการแบ่งตัวของเซลล์ หรือทั้งการยืดตัวและการแบ่งตัวของเซลล์

การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือราก

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พาเรนไคมาเป็น ยอด ราก ใบหรือดอกนั้น เกิดจาก 2 กระบวนการ คือ

1. Organogenesis คือการเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นโดยการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาใกล้เคียงเป็น meristematic cell ขนาดเล็ก แวคิวโอลเล็กและมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้น มีอัตราแบ่งตัวสูง อาจเรียกได้ว่า Meristemoids ที่สามารถเจริญเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก ได้อย่างอิสระตามแต่จะได้รับการกระตุ้น

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

ไม่ว่าจะผ่าน Organogenesis หรือ Embryogenesis ก็ตาม การเกิด Morphogenesis จะมีการพัฒนาของเซลล์ใน 2ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เจริญและพัฒนาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็นจุดกำเนิดยอดหรือรากโดยต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมีในอาหาร อุณหภูมิ และแสงทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง มีแวคิวโอลเล็ก และไซโตพลาสซึมเข้มขึ้น สร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเพิ่ม รวมถึงมีการแบ่งตัวเร็วมาก กลุ่มเซลล์นี้จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดยอด ราก หรือ Embryoids

ระยะที่ 2 เมื่อเกิดจุดกำเนิดยอดหรือราก หรือ Embryoids แล้วหลังจากได้รับอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมจะเจริญเป็นต้นและ/หรือ รากที่สมบูรณ์ได้โดย พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์มีดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

อนุรักษ์ และนิตย์ศรี (2535) รายงานว่าการศึกษาระยะการเจริญของข้าวโพดพันธุ์ SW_3 x INV ในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า lag phase อยู่ในช่วง 0-15 วัน และ stationary phase และ death phase อยู่หลังจากวันที่ 15 และ นิตย์ศรี และคณะ (2536) รายงานว่าสามารถชักนำการเกิดเป็นต้นใหม่จากส่วนของแคลลัสในข้าวโพด 7 สายพันธุ์ และต่อมา อนุรักษ์ และนิตย์ศรี (2541) ศึกษาระยะการเจริญของข้าวโพดพันธุ์ SW_5 ในอาหารเหลวสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า lag phase อยู่ในช่วง 0-6 วัน log phase อยู่ในช่วง 6-14 วัน และ stationary phase และ death phase อยู่หลังจากวันที่ 14 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยไปศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhodes และคณะ (1988) ได้ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพด พบว่าการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ได้ผลดีเมื่อเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อโดยใช้โพรโทพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจากเอ็มบริโอและสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ โดยโพรโทพลาสต์ของข้าวโพดสามารถเจริญบนตัวกรองเหนือเซลล์ชั้นพี่เลี้ยงโดยตรงในอาหารเหลว สภาพแวดล้อมเริ่มต้นและการเจริญของชั้นเซลล์พี่เลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญในการได้มาซึ่งประสิทธิภาพ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ โพรโทพลาสต์ถูกย่อยได้จากเซลล์แขวนลอยที่พัฒนามาจากเอ็มบริโอซึ่งให้แคลลัสที่ทนต่อลักษณะแรงดันของการเพาะเลี้ยงในช่วงแรก จากการศึกษาได้ผลดีกับโพรโทพลาสต์ของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ A188 และ B73-1 สามารถเจริญเป็นต้นใหม่จากการเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่แยกได้

Sun และคณะ (1989) สามารถแยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม Supersweet (sh2sh2) โดยนำเซลล์แขวนลอยมาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส และเพคโตไลเอส ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ นำโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1\text{-}3x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6P หรือ N_6K โดยวิธีชั้นเซลล์พี่เลี้ยง จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร D19 โดยวิธีมีเซลล์พี่เลี้ยง และไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PRM1 และสูตร PRM2 สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร GR-1 จะได้ต้นที่มีระบบรากที่สมบูรณ์

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

การถ่ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ อโกรแบคทีเรียม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

1. ใช้กรดอะมิโนไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง 3-ketolactose

1.1. ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *A. tumefaciens*

1.2. ไม่ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *A. radiobacter*

2. ไม่ใช้กรดอะมิโนไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง 3-ketolactose

2.1. ทำให้เกิดรากฝอย คือ *A. rhizogenes*

2.2. ทำให้เกิดปุ่มปมบนราสเบอรี่ คือ *A. rubi*

พลาสมิดในอโกรแบคทีเรียม

อโกรแบคทีเรียมมีพลาสมิดขนาด 140-235 กิโลเบส เรียกว่า Tumor-inducing หรือ Ti plasmid ซึ่งสามารถทำให้พืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดเกิดอาการ crown gall tumor คือพืชที่มีลักษณะเป็นปุ่มปม เนื่องจากเนื้อเยื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว หลังจากได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลบนต้นพืช การเกิดปุ่มปมจะเข้าไปขัดขวางการเจริญของพืชหรือทำให้พืชตายเพราะเข้าไปรบกวนระบบหมุนเวียนของน้ำและอาหารในพืช ส่วนของ T-DNA (transferred DNA) ใน Ti plasmid จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชที่ได้รับการปลูกย้ายยีน ทำให้เกิดเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปม ยีนในส่วน T-DNA มีบทบาททำให้พืชสร้างโอปีน (Opine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน โอปีนมี 2 ชนิด คือ Octopine และ Noplaine นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้าง Agropine ซึ่งค้นพบใหม่ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนคือ octopine dehydrogenase หรือ nopaline dehydrogenase ที่ถูกกำหนดโดยยีนบนส่วน T-DNA ซึ่งมียีนควบคุมการสร้างฮอร์โมนมีผลกระตุ้นให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวและเจริญอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มปม

กลไกการย้ายยีนของ *A. tumefaciens*

ในการศึกษากลไกของอโกรแบคทีเรียมนี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอโกรแบคทีเรียม ในปี 1979 Ohyama และคณะ ศึกษาพบว่าหลังจากที่มีการปลูกเชื้อบนชิ้นส่วนพืชแล้ว แบคทีเรียจะใช้เวลาประมาณ 20–60 นาที ในการเชื่อมติดกับเซลล์พืช ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของพืชและวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเชื่อมติดไม่ต้องการ Ca^{2+} และถ้ามีจะเกิดการยับยั้งการเชื่อมติด อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25–30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 6.0

รูปแบบของการติดของเชื้ออโกรแบคทีเรียมโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการยึดเกาะของอโกรแบคทีเรีย กับยาสูบและแครอท คือ

ระยะที่1 แบคทีเรียจะยึดเกาะที่ตำแหน่งเป้าหมาย (Receptor = R) ที่จำเพาะบนผิวของเซลล์พืชดังแสดงในรูปที่ 1.

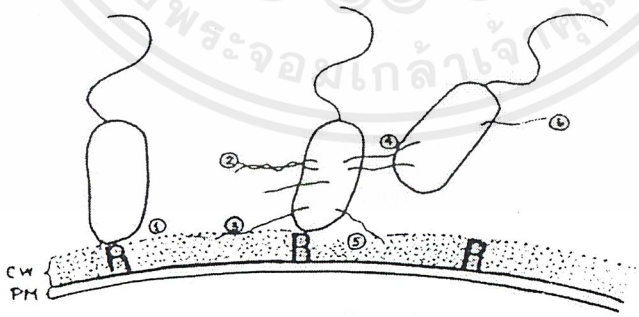
ระยะที่2 หลังจากเกิดการยึดเกาะแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยเซลลูโลส

ระยะที่3 เส้นใยเซลลูโลสจะยึดเกาะแบคทีเรียที่ผิวของผนังเซลล์ (CW) ซึ่งพืชไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและแยกแบคทีเรียออกจากเซลล์พืชได้

ระยะที่4 เส้นใยที่มีความยาวจะยึดกับแบคทีเรียตัวอื่น

ระยะที่5 แบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชจะปล่อยเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชทำให้เกิดการสัมผัสระหว่างแบคทีเรียกับพลาสมาเมมเบรน (PM) ของเซลล์พืช ต่อมาจะทำให้เกิดการเคลื่อนย้าย Ti plasmid จากแบคทีเรียไปสู่เซลล์พืช

ระยะที่6 แบคทีเรียที่ถูกจับโดยเส้นใยจะมีการสร้างเส้นใยอีกด้วยตัวเองทำให้มีการยึดเกาะทางอ้อมกับเซลล์พืชและเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชผ่านตำแหน่งเป้าหมายและเส้นใยเซลลูโลส



รูปที่1 แบบจำลองการยึดเกาะของ *A. tumefaciens* ตัวเลขในวงกลมแสดงถึงระยะต่าง ๆ ตามที่กล่าวถึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Jeanette L. Rasmussen และคณะ (1994) ได้ศึกษาการย้ายดีเอ็นเอของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5αF และอโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ A208 โดยวิธีการไมโครโปรเจคไทล์นำดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์แขวนลอยของยาสูบสายพันธุ์ NT1 และข้าวโพดพันธุ์ Black Maxican Sweet โดยเตรียมแบคทีเรียด้วยฟีนอลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยง E. coli ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนซึ่งใช้หัวเชื้อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเหลว LB ที่ค่าการดูดกลืนแสง 0.02-0.05 ที่ 600 นาโนเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนโดยตรวจสอบจากยีน GUS ที่ใช้เป็นพาหะ

Brigitte K และ Horst Lorz (1995) ได้ทำการแยกโพรโทพลาสต์โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ และเพคติเนสวาย 23 0.078 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสมของไมโครสปอร์ของข้าวโพดหลายสายพันธุ์ นำโพรโทพลาสต์ที่มีความหนาแน่น $1.5x10^5$ โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูโคส 10 กรัม และสามารถชักนำโพรโทพลาสต์ข้าวโพดลูกผสม H99 กับ FR-16-I ให้พัฒนาเป็นแคลลัสและชักนำให้เป็นต้นได้

Halluin และคณะ (1992) ได้ทำการย้ายยีนโดยวิธีอิเล็คโตรโพเลชั่น ใช้พลาสมิด pDE 108 ในข้าวโพดพันธุ์ H99 และ Pa91 โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในที่มืดที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในอาหาร N_6 ที่ประกอบด้วย เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 6 มิลลิโมล MES 0.5 กรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 0.75 กรัมต่อลิตร ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 1.6 กรัมต่อลิตร เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5.8 พบว่าแคลลัสที่ได้รับการย้ายยีนจะสามารถต้านทานต่อสารกานาไมซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Welter และคณะ (1995) ได้ทำศึกษาการพัฒนารูปร่างของเอ็มบริโอข้าวโพดพันธุ์ Hi-II ไปเป็นแคลลัสหลาย ๆ ตัวอย่างโดยทำการใช้เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ตรึงในกลูตารอลดีไฮด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนอาหาร N_6 โดย 7 วันแรกจะให้ความเข้มแสงต่ำเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นจะให้ความเข้มแสงสูงระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเอ็มบริโอของข้าวโพดที่พัฒนาไปเป็นแคลลัสชนิด friable ประกอบไปด้วยลักษณะรูปร่างหลายแบบในช่วงต่าง ๆ ระหว่างการเปลี่ยนอาหารจะทำให้ได้แคลลัสที่มีรูปร่างชนิด typeII 3 แบบ ได้แก่ pre-embryogenic early-embryogenic และ late-embryogenic แคลลัสถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน จากการทดลองแสดงถึงความสัมพันธ์ของการพัฒนา และการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ทำให้ทราบว่าลักษณะรูปร่างทั้ง 3 แบบ สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้โดยผ่าน somatic embryogenesis

Marie-Francoise J. และคณะ (1995) ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอด DNA และการแสดงออกของ β-glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพดโดยวิธีอิเลคโตรโพเลชั่น พบว่าสามารถนำ DNA อิสระเข้าไปในไมโครสปอร์ของข้าวโพดลูกผสมได้ ซึ่งการเลือกสารละลายสำหรับทำเลคโตรโพเลชั่นพิจารณาจากความสามารถที่ให้การเจริญเป็นต้นใหม่ได้จำนวนมาก การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีเอสถูกยับยั้งโดยการเพิ่มโปแตสเซียมไนเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต 100 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายสำหรับทำอิเลคโตรโพเลชั่น การแสดงออก 7 ลักษณะของเวกเตอร์ได้แก่ ยีนรายงานผล Uid A ที่ถูกควบคุมโดยโมเซอิคไวรัสของดอกกะหล่ำ ยีน Lat 52-7 Zmg 13 Emu Ubig-1 Al หรือยีนโปรโมเตอร์ Act 1 ใช้ทดสอบความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ β-glucuronidase ในไมโครสปอร์ของข้าวโพด ระดับการแสดงออกสูงสุดเมื่อยีน Uid A ถูกขับโดยยีนโปรโมเตอร์ Act 1 ดังนั้นเวกเตอร์ตัวนี้จึงมีการใช้ต่อไปเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ระดับการแสดงออกของ β-glucuronidase สูงสุด

Wan และคณะ (1995) ศึกษาการย้ายยีนโดยวิธี microprojectile bombardment เข้าสู่ แคลลัสของข้าวโพดได้สำเร็จ

Yuji และคณะ (1996) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์ A188 โดยการย้ายโอนยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 (pSB 131) สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยเลี้ยงในอาหาร LSD ที่เติมยาปฏิชีวนะ phosphinothricin และทดสอบการแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ออกของยีนกัส พบว่ามีการแสดงออกของยีน และ การทำ sounthen blot เพื่อยืนยันว่าสามารถย้ายยีนได้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35858

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ฝักข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 (*Zea may* L.)
2. เชื้ออโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium. tumefaciens*)
    - 2.1. สายพันธุ์ AGL-1
    - 2.2. สายพันธุ์ LBA 4404
    - 2.3. สายพันธุ์ EHA 105
3. สารเคมี
    - 3.1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็งสูตร N_6
    - 3.2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LB
    - 3.3. สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)
    - 3.4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ 2,4-D NAA ซีเอติน ไคเนติน และ BAP
    - 3.5. กรดอะมิโน ได้แก่ แอล-โพรลีน และ เคซีนไฮโดรไลเซส
    - 3.6 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
    - 3.7 อะซิโตไซลิงโกน
    - 3.8 ไฮโกรมัยซิน
    - 3.9 ไซโฟเทกซิม
    - 3.10 สารละลาย GUS-buffer
4. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ
    - 4.1. บีกเกอร์
    - 4.2. ขวดรูปชมพู่
    - 4.3. ปิเปตต์
    - 4.4. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
    - 4.5. จานแก้ว
    - 4.6. แท่งแก้วคน
    - 4.7. กระบอกตวง
    - 4.8. มีดผ่าตัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9. ปากคีบ

4.10. อะลูมิเนียมฟลอย

4.11. ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.12. ตู้ปลอดเชื้อ

4.13. เครื่องเขย่า

4.14. ไมโครเวฟ

4.15. ตู้บ่มเชื้อ

4.16. ไมโครไปเปต และ ทิป ขนาดต่างๆ

4.17. อุปกรณ์การกรองแบคทีเรียและแผ่นกรองแบคทีเรีย

4.18. หม้อนึ่งความดัน

4.19. ตู้อบ

4.20. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

4.21 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ

4.22 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

4.23 กล้องสเตอริโอ

4.24 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ภาพ

การทดลองที่ 1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2

1. นำฝักข้าวโพดที่มีอายุ 14 วันหลังจากการผสมเกสรมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยแช่ฝักข้าวโพดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่เติมคลอรอกซ์ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 20 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

2. ใช้ปลายมีดแคะเอ็มบริโอของข้าวโพดออกมา แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีความเข้มข้นของ NAA 3 ระดับคือ 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) ทุกสูตรมีส่วนประกอบของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล 2.6 กรัม

3. นำไปบ่มในที่มืดที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการตัดยอดและรากออก แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

4. เลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน วัดค่าการเจริญเติบโตของแคลลัสแล้วบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. แสดงสูตรอาหาร N_6 ที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นแคลลัส

ฮอร์โมน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	$N_6$1	$N_6$2	N_6 3
2,4-D	2	2	2
NAA	0	0.5	1

การทดลองที่ 2. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด

1. เตรียมอาหารสูตร N_6 ที่ใช้ในการชักนำแคลลัสของข้าวโพดให้เจริญเป็นต้นใหม่ โดยให้มีส่วนประกอบของอาหารและความเข้มข้นต่างกัน 8 สูตร (ตารางที่ 4) ทุกสูตรมีส่วนประกอบของ แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และเทอาหารแต่ละสูตรเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อให้มีความหนาพอสมควร

2. นำแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงมาเป็นเวลา 30 วัน มาทำการตัดยอดและรากเดิมออก

3. นำแคลลัสที่ผ่านการตัดยอดและรากเดิมออกแล้วมาเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ข้างต้นโดยนำแคลลัสใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแต่ละสูตร สูตรละ 10 แคลลัส

5. นำไปเลี้ยงต่อในที่มีแสงสว่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

6. นำจานเพาะเชื้อแต่ละจานมาทำการนับจำนวนยอดและรากที่เกิดขึ้นใหม่

7. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 4. แสดงค่าความเข้มข้นของสารประกอบต่าง ๆ ในอาหารสูตร N_6 ที่ใช้ในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด

ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของไฟตาเจล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของซีเอติน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0.1	2.6	0.5
	2.6	1.0
	5.2	0.5
	5.2	1.0
0.25	2.6	0.5
	2.6	1.0
	5.2	0.5
	5.2	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

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

1. เตรียมอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ซึ่งมีความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ในระดับที่แตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5)

2. นำเอ็มบริโออายุ 1 วัน และแคลลัสอายุ 7 วันมาใส่ในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับที่แตกต่างกันระดับละ 10 เอ็มบริโอ

3. นำไปเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4. สังเกตผลของไฮโกรไมซิน บี ว่าที่ความเข้มข้นใดที่ทำให้เอ็มบริโอ และแคลลัสไม่สามารถเจริญได้

5. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 5. แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดสอบหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสต่อไฮโกรไมซิน บี

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4. การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้ยีนจากอโกรแบคทีเรียมเข้าสู่เอ็มบริโอของข้าวโพด ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ดังนี้ อายุของเอ็มบริโอ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และ สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม (ตารางที่ 6)

1. เลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ AGL-1 LBA 4404 และ EHA 105 ในอาหารสูตร LB (รูปที่ 2 ก) โดยในแต่ละสายพันธุ์มีโครงสร้างของ pCAMBIA 1301 (รูปที่ 2 ข)

2 . นำเอ็มบริโอที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน โดยนำมาตัวอย่างละ 20 เอ็มบริโอมาใส่ในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนประกอบของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 0.69 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 2.6 กรัม และอะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้นสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วนำมาหยดเชื้ออโกรแบคทีเรียม ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้ออโกรแบคทีเรียมเจริญ

4. นำเอ็มบริโอมาล้างฆ่าเชื้ออโกรแบคทีเรียมด้วยไซโฟแทกซินที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 2 ครั้ง

5. แยกเอ็มบริโอตัวอย่างมาตัวอย่างละ 10 เอ็มบริโอมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนกัสโดยย้อมใน X-gulc ที่มีส่วนผสมของ GUS-buffer (ภาคผนวกที่ 1) ส่วนอีก 10 เอ็มบริโอนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยมีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 3 เพื่อตรวจสอบดูความต้านทานของข้าวโพดที่ถูกย้ายยีนที่มีต่อไฮโกรไมซิน บี

6. ตรวจสอบผลของการย้ายยีนโดยการสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนเอ็มบริโอ

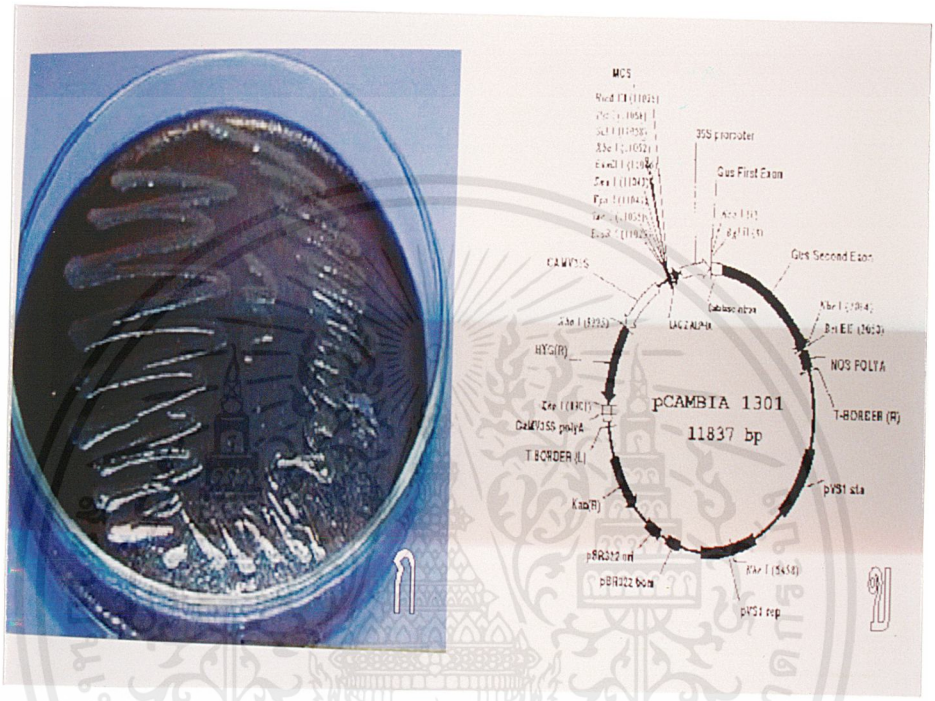
7. บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6. แสดงความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนและสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนดขึ้นในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียมทั้ง 3 สายพันธุ์

เชื้ออโกรแบคทีเรียม	อายุของเอ็มบริโอ (วัน)	อุณหภูมิในการบ่ม (องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
สายพันธุ์ AGL-1	1	25	50 / 100
		28	50 / 100
	3	25	50 / 100
		28	50 / 100
	5	25	50 / 100
		28	50 / 100
	7	25	50 / 100
		28	50 / 100
สายพันธุ์ LBA 4404	1	25	50 / 100
		28	50 / 100
	3	25	50 / 100
		28	50 / 100
	5	25	50 / 100
		28	50 / 100
	7	25	50 / 100
		28	50 / 100
สายพันธุ์ EHA 105	1	25	50 / 100
		28	50 / 100
	3	25	50 / 100
		28	50 / 100
	5	25	50 / 100
		28	50 / 100
	7	25	50 / 100
		28	50 / 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2. แสดงลักษณะการเจริญของเชื้ออโกรแบคทีเรียมและโครงสร้างของพลาสมิด

ก. การเลี้ยงเชื้ออโกแบคทีเรียม

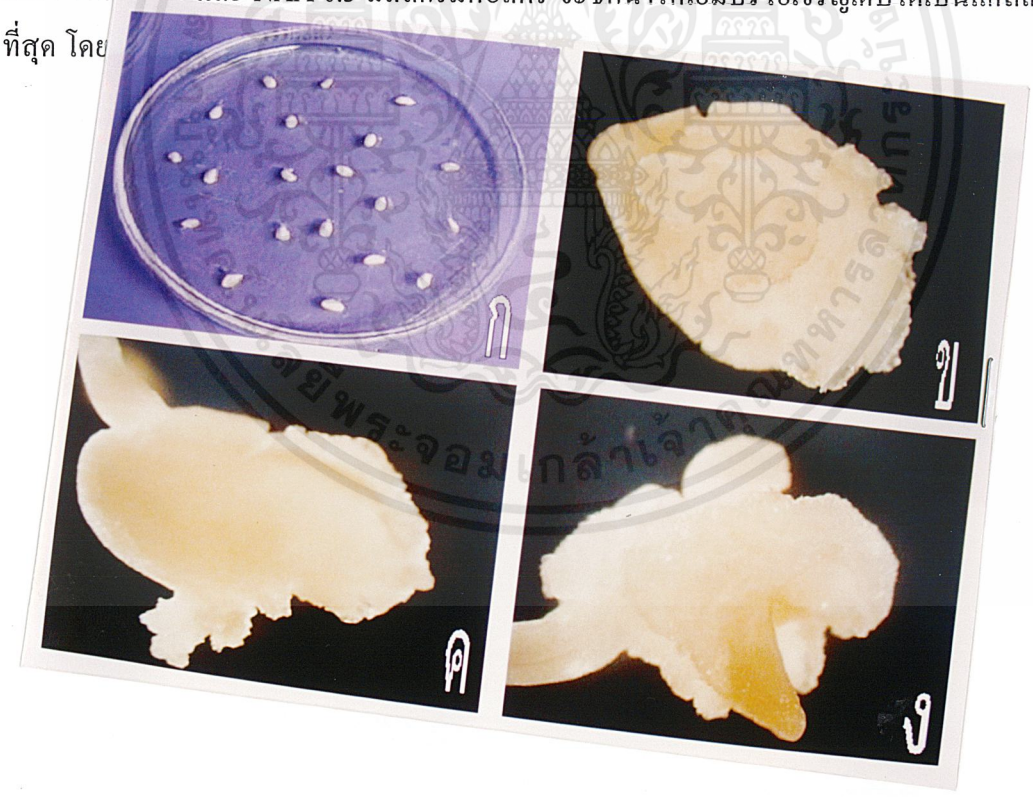
ข. พลาสมิด pCAMBIA 1301

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4 D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) การเจริญของแคลลัสเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วันหลังจากตัดยอดและรากเดิมออกแล้วปรากฏว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ (รูปที่ 3 ก ข ค และ ง) โดยแคลลัสที่อยู่ในอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดย



รูปที่ 3. แสดงลักษณะเอ็มบริโอของข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. เอ็มบริโออายุ 1 วัน **ข.** เอ็มบริโออายุ 3 วัน

ค. เอ็มบริโออายุ 5 วัน **ง.** เอ็มบริโออายุ 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

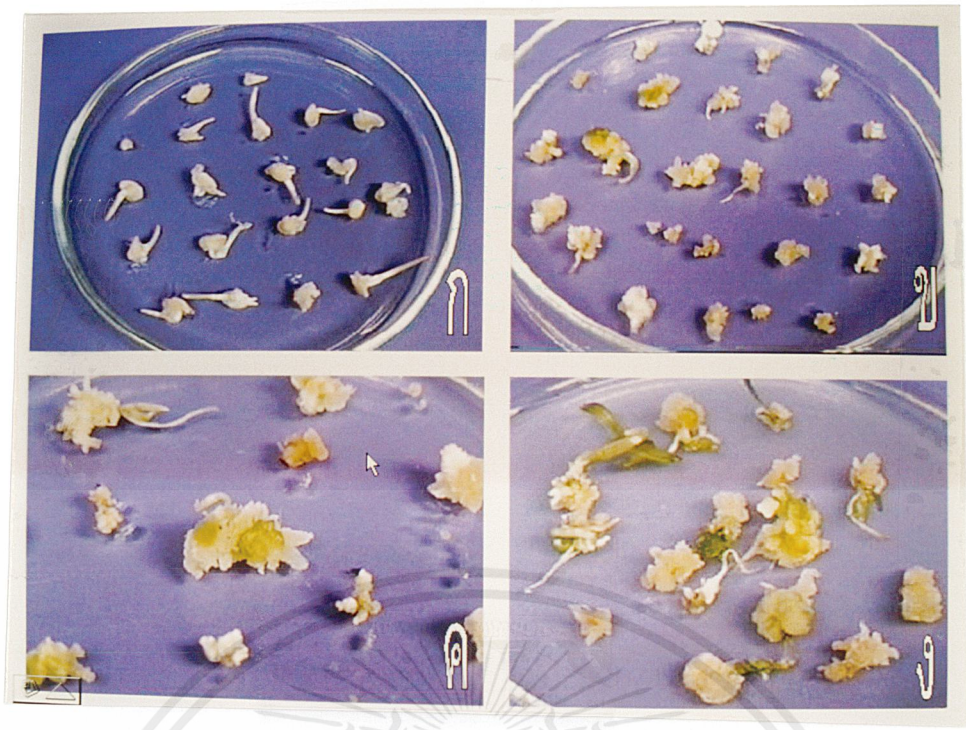
การทดลองที่ 2. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด

ในการชักนำแคลลัสของข้าวโพดให้เจริญเป็นต้นใหม่จะทำโดยนำแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด โดยใช้อาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีความเข้มข้นของสารประกอบในสูตรอาหารต่างกัน 8 ระดับ (ตารางที่ 4) ปรากฏว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย NAA ไฟตาเจล และซีเอติน สามารถชักนำให้เกิดเป็นยอดและราก (รูปที่ 4 ก ข ค และ ง) ซึ่งผลการทดลองการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพดจะแสดงในตารางผลการทดลอง (ตารางที่ 7) โดยดูจากเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและราก และสามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นข้าวโพดที่สมบูรณ์ได้ (รูปที่ 5 ก ข ค และ ง)

ตารางที่ 7. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและรากโดยการชักนำของอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย NAA ไฟตาเจล และซีเอติน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของไฟตาเจล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของซีเอติน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนการเกิดยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนการเกิดราก (เปอร์เซ็นต์)
0.1	2.6	0.5	80	0
		1	66.7	30
	5.2	0.5	72.3	30.56
		1	90	45
0.25	2.6	0.5	70	10
		1	70	15
	5.2	0.5	54.17	41.67
		1	65	45

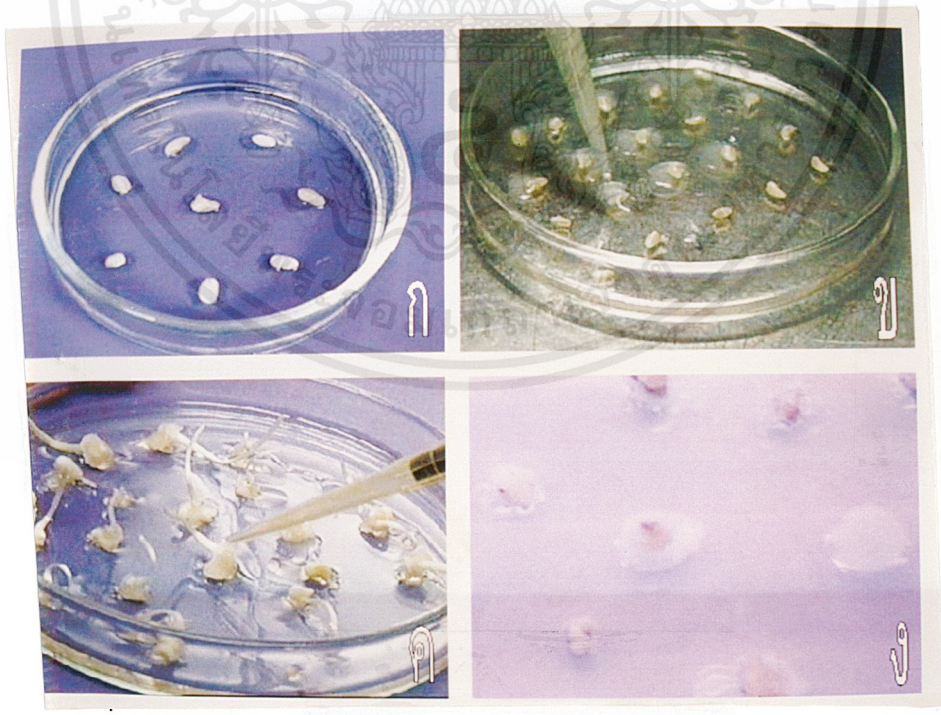
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. แสดงการเจริญของแคลลัสไปเป็นยอดและรากของข้าวโพดโดยการชักนำของอาหารสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย NAA ไฟตาเจล และซีเอติน

ก. เอมบริโอที่เจริญเติบโตเป็นแคลลัส ข. แคลลัสที่ผ่านการตัดยอดและรากเดิมออกแล้ว

ค. และ ง. แคลลัสที่ถูกชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่



รูปที่ 5. แสดงการเกิดเป็นต้นข้าวโพดโดยการชักนำแคลลัส

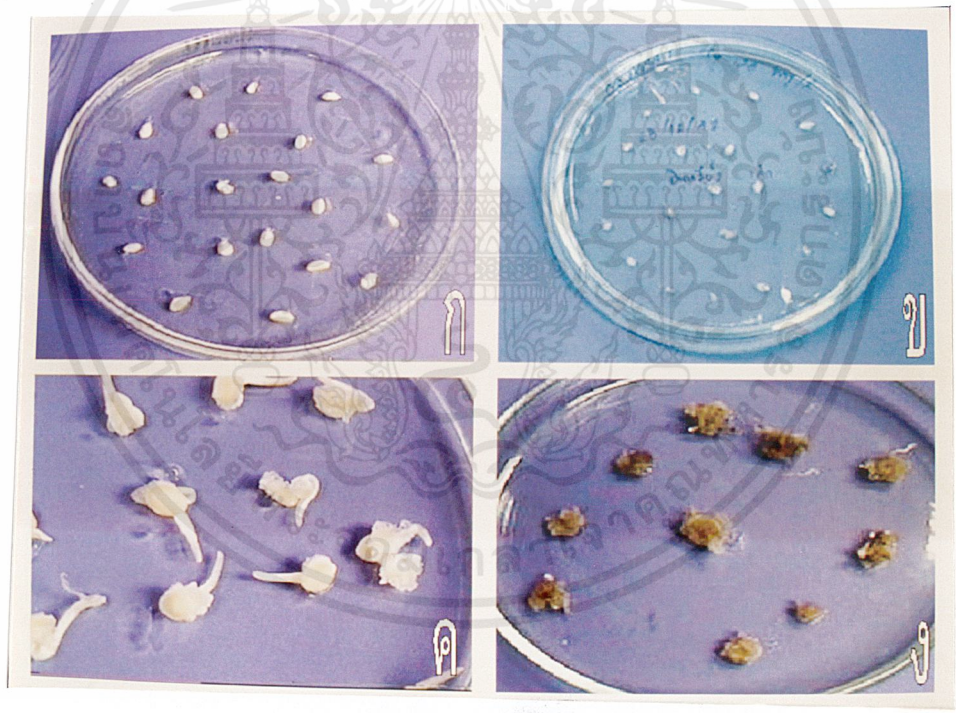
ก. การพัฒนาของแคลลัส ข. การพัฒนาเป็นยอดและราก

ค. การพัฒนาเป็นยอด ง. การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

จากการนำเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน (รูปที่ 6 ก) มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) ผลปรากฏว่าเอ็มบริโอที่อยู่ในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่สามารถเจริญได้ซึ่งแสดงว่าที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เอ็มบริโอของข้าวโพด ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 6 ข) และแคลลัสของข้าวโพดที่มีอายุ 7 วัน (รูปที่ 6 ค) ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 40 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้แคลลัสของข้าวโพดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 6 ง)



รูปที่ 6. แสดงความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

ก. เอ็มบริโอของข้าวโพดอายุ 1 วัน

ข. เอ็มบริโอของข้าวโพดอายุ 1 วัน ที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

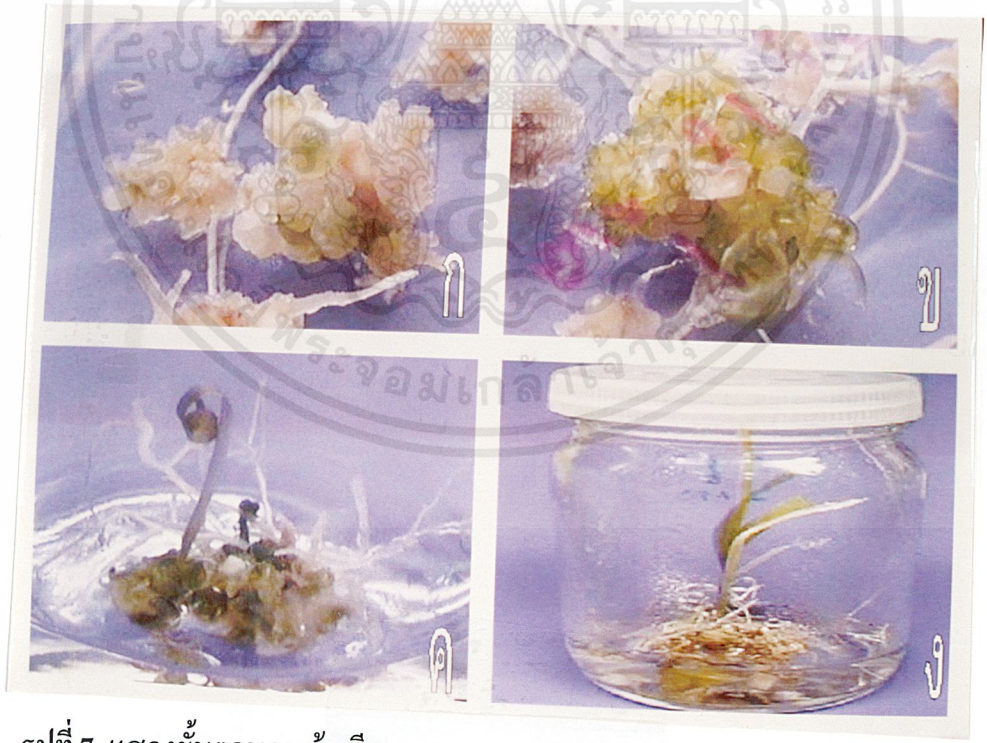
ค. แคลลัสของข้าวโพดอายุ 7 วัน

ง. แคลลัสของข้าวโพดอายุ 7 วัน ที่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4. การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียมเข้าสู่เอ็มบริโอของข้าวโพดโดยศึกษาถึง อายุของเอ็มบริโอ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และสายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม โดยนำเอ็มบริโอที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน (รูปที่ 7 ก) มาเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่มีส่วนประกอบของอะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้นสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาหยดเชื้ออโกแบคทีเรียมทั้ง 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 7 ข และ ค) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 7 ง) ตรวจสอบผลของการย้ายยีนจะสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงินปรากฏอยู่บนเอ็มบริโอ (รูปที่ 8 ก ข ค และ ง) จากผลการทดลองพบว่าเอ็มบริโออายุ 1 วัน เชื้อสายพันธุ์ LBA 4404 และ EHA 105 ที่อะซิโตไซลิงโกน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุด เอ็มบริโออายุ 3 วัน เชื้อสายพันธุ์ LBA 4404 ที่อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการถ่ายยีนดีที่สุด ส่วนเอ็มบริโออายุ 5 วัน เชื้อสายพันธุ์ AGL 1 และ EHA 105 ที่อะซิโตไซลิงโกน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุด และ เอ็มบริโออายุ 7 วัน เชื้อสายพันธุ์ AGL 1 ที่อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการถย้ายยีนดีที่สุด



รูปที่ 7. แสดงขั้นตอนการย้ายยีน

ก. เอ็มบริโอที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน

ข. หยดเชื้ออโกแบคทีเรียมทั้ง 3 สายพันธุ์บนเอ็มบริโออายุ 1 3 และ 5 วัน

ค. หยดเชื้ออโกแบคทีเรียมทั้ง 3 สายพันธุ์บนเอ็มบริโออายุ 7 วัน

ง. ลักษณะของเชื้อที่ขึ้นคลุมเอ็มบริโอ บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ อายุ 1 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	70	4	0	0	1	6	10
	100	0	10	0	0	0	0	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	60	4	0	0	2	4	10
EHA 105	50	70	3	0	0	0	7	10
	100	10	9	0	0	0	1	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ อายุ 3 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	70	3	0	0	0	7	10
	100	60	4	0	0	0	6	10
AGL-1	50	10	9	0	0	0	1	10
	100	60	4	0	0	2	4	10
EHA 105	50	30	7	0	0	0	3	10
	100	40	6	0	0	1	3	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และEHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโออายุ 5 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	60	4	4	0	0	2	10
	100	40	6	1	0	0	3	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	80	2	1	0	0	7	10
EHA 105	50	10	9	0	0	0	1	10
	100	80	2	3	0	0	5	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และEHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ อายุ 7 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	10	5	0	0	0	5	10
	100	40	6	1	0	0	3	10
AGL-1	50	20	8	0	0	0	2	10
	100	50	5	1	1	0	3	10
EHA 105	50	30	7	0	0	0	3	10
	100	40	6	1	0	0	3	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และEHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ อายุ 1 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	20	8	0	0	0	2	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	0	10
EHA 105	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และEHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ อายุ 3 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	30	7	0	0	1	2	10
	100	60	4	1	0	0	5	10
AGL-1	50	60	4	0	0	0	6	10
	100	20	8	0	0	0	2	10
EHA 105	50	60	4	0	0	0	6	10
	100	50	5	0	0	0	5	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และEHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโออายุ 5 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	0	10
AGL-1	50	60	4	0	1	2	3	10
	100	40	6	0	0	0	4	10
EHA 105	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8. ผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และ EHA 105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15. แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 AGL-1 และEHA105 ในเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ อายุ 7 วัน ดูจากกล้องสเตอริโอ					
			0	1	2	3	4	รวม
LBA 4404	50	10	9	0	0	1	0	10
	100	0	10	0	0	0	0	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	0	10
EHA 105	50	0	10	0	0	0	0	10
	100	10	9	0	0	0	1	10

หมายเหตุ การรายงานผลของการถ่ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

0 = ไม่มี

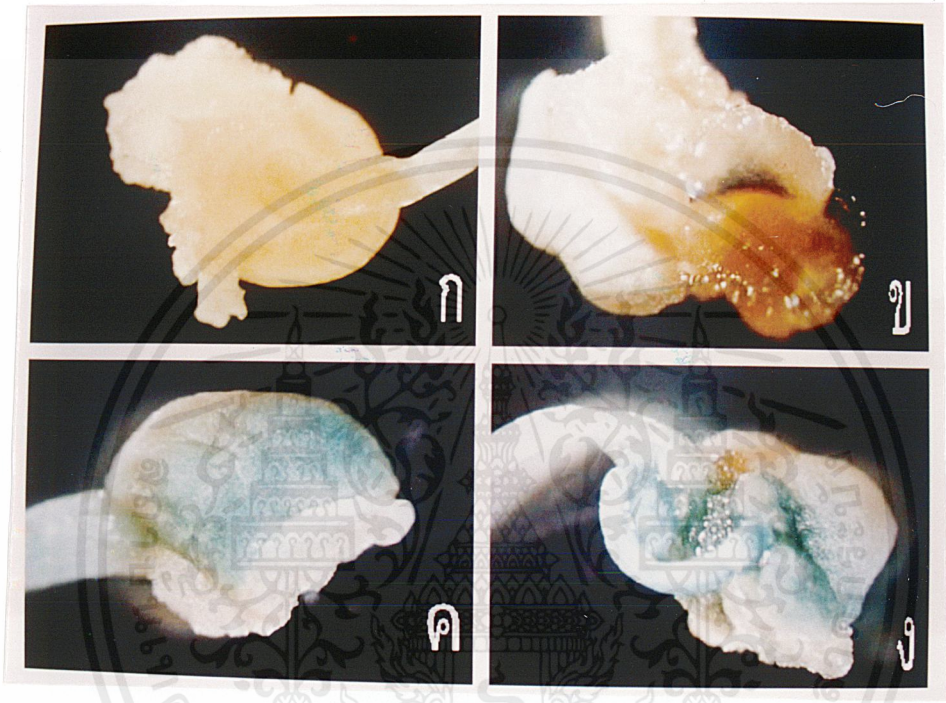
1 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

2 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 1

3 = สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอชัดกว่าระดับที่ 2

4 = สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8. แสดงผลของการย้ายยีนโดยตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอและตาเปล่า

ก. ไม่มีการแสดงออกของกัสยีน

ข. การแสดงออกของกัสยีนสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องสเตอริโอ

ค. การแสดงออกของกัสยีนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ง. สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1. การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2

จากผลการทดลองที่ 1 การหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 โดยเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) การเจริญของแคลลัสเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วันหลังจากตัดยอดและรากเดิมออกแล้วปรากฏว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้แต่

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพดในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4 D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด

การทดลองที่ 2. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวโพด

ในการชักนำแคลลัสของข้าวโพดให้เจริญเป็นต้นใหม่จะทำโดยนำแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วย NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร และซีเอติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอดและเป็นรากดีที่สุดและสามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นข้าวโพดที่สมบูรณ์ได้

การทดลองที่ 3. การหาความต้านทานของเอ็มบริโอและแคลลัสของข้าวโพดต่อไฮโกรไมซิน บี

จากการนำเอ็มบริโอของข้าวโพดพันธุ์อินทรีย์ 2 อายุ 1 วัน และแคลลัสของข้าวโพดที่มีอายุ 7 วัน มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร N_6 ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอที่มีอายุ 1 วันไม่สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตได้ ในอาหารที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลลัสที่มีอายุ 7 วันไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 4. การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

ผลของการย้ายยีนในเอ็มบริโอที่มีอายุต่าง ๆ กันคือ 1 3 5 และ 7 วัน จะตรวจสอบโดยการใช้ เอ็มบริโอมาแช่ในสารละลาย GUS-buffer ซึ่งจะสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงินปรากฏอยู่บนแคลลัส แสดงว่ามีการย้ายยีนเข้าไปในส่วนของเนื้อเยื่อได้ สรุปได้ว่า

เอ็มบริโออายุ 1 วัน เชื้อสายพันธุ์ LBA 4404 และ EHA 105 ที่อะซิโตไซลิงโกน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุด

เอ็มบริโออายุ 3 วัน เชื้อสายพันธุ์ LBA 4404 ที่อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการถ่ายยีนดีที่สุด

เอ็มบริโออายุ 5 วัน เชื้อสายพันธุ์ AGL 1 และ EHA 105 ที่อะซิโตไซลิงโกน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการย้ายยีนดีที่สุด

เอ็มบริโออายุ 7 วัน เชื้อสายพันธุ์ AGL 1 ที่อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้น100 มิลลิกรัม ต่อลิตร และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการถย้ายยีนดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 วิธีทดสอบกัสแอสเส (GUS Assay)

เป็นวิธีการตรวจสอบว่ามีการย้ายยีนในเอ็มบริโอของข้าวโพดโดยการตรวจสอบยีนกัส ทำโดยการนำเอ็มบริโอมาตรวจด้วยสารละลายหลายชนิดดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียม buffer solution stocks ต่อไปนี้
   1.1 Solution A (0.2M $NaPO_4$) ใน 100 มิลลิลิตร ใช้ $Na_2HPO_4.7H_2O$ 2.09 กรัม NaH_2PO_4 1.48 กรัม และ $Na_2EDTA.2H_2O$ 1.86 กรัม
   1.2 Solution B (0.1M) ใน 10 มิลลิลิตร ใช้ $K_3Fe(CN)_6$ 0.329 กรัม
   1.3 Solution C (0.1M) ใน 10 มิลลิลิตร ใช้ $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ 0.422 กรัม
   1.4 Solution D (0.1%) ใน 10 มิลลิลิตร ใช้ Triton X-100 10 ไมโครลิตร
   หมายเหตุ เมื่อยังไม่ใช้ให้เก็บสารละลายทั้งหมดโดยการแช่แข็ง
2. ละลาย X-Glue 13 มิลลิกรัม (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-glucuronide) ใน 0.25 มิลลิลิตร DMSO (dimethyl sulfoxide)
3. นำ Solution A B C และ D จำนวน 5 0.25 0.25 และ 0.003 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมลงในหลอดพร้อมกับน้ำสะอาดอีก 4.5 มิลลิลิตร
4. เขย่าส่วนผสมนี้ให้ดีซึ่งจะได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไป filter sterilization สารละลายนี้ใช้ได้กับ 10 ตัวอย่าง
5. นำสารละลายมาใส่ในเอ็มบริโอให้ท่วม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
6. ดูดของเหลวทิ้งแล้วแช่ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ให้ท่วม แล้วนำไปตรวจการแสดงออกของยีนกัส จะมองเห็นเป็นสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงสูตรอาหารแข็งสูตร 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

กรมวิชาการเกษตร, ข้าวโพด. เอกสารทางวิชาการเล่มที่ 4. กรุงเทพฯ. 2545. 291 หน้า.

กอบเกียรติ แสงนิล. 2532. การเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวโพดเพิ่มระดับความทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

นิตย์ศรี แสงเดือน อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม ประศาสตร์ เกื้อมณี และชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2536. การชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเอมบริโออ่อนของข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์ การเกษตร ฉบับที่ 26 (4-6) 67 - 79 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2535. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการ เลี้ยงเซลล์ แขวนลอยของ ข้าวโพดลูกผสม SW3 x INV. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 749-754 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ ข้าวโพดลูกผสม SW_5 ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่24. 608-609 น.

Armstrong, C.L and C.G. Green . 1985. Establishment and maintenance of friable embrogenic maize callus and the involvement of L-proline . Planta. 164: 207-214.

Brigitte Krautwig and Horst Lorz. 1995. Single androgenetic structures of maize (Zea mays L.) for the initiation of homogenous cell suspention and protoplast cultures". Plant Cell Reports. 14. 477-481.

Chourey, P.S. and D.B. Zurawski. 1981. Callus formation from protoplasts of a maize cell culture. Theor. Appl. Genet. 59: 341-344.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C. S., Hus, C., Yin K .C ., and C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18 : 695-668.

Duncan, D.R., William, M.E., Zehr, B.E. and J.M. Widholm. 1985 . The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. Planta. 165: 322-332.

Duncan, D.R., and J.M. Widholm. (1987). Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. Plant Physiol, 83: 705-708.

Green, C.E and R.L. Philips. (1975). Plant regenerate from tissue culture of maize. Crop Sci, 15: 417-421

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Imbrie-miligan, C.W., K.K Kamo and T.K. Hodges. 1987 . Microcallus growth from maize protoplasts. Planta. 171 : 58-64.

Imbrie-Milligan. C.W. and T.K. Hodges. 1986. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus . Planta. 168 : 395-401.

Jeanette L. Rasmussen, Jjulie R. Kikkert, Mihir K. Roy, and John C. Sanfort. (1994). Biolistic transformation of tobacco and maize suspention cells using bacterial cells as microprojectiles. Plant Cell Reports, 13 : 212-217.

Kamo, K.K., K.L. Chang, M.E. Lynn and T.K. Hodges. 1987. Embryogenic callus formation from maize protoplasts . Planta. 172 : 245-251.

Kathleen D'Halluin, E Bonne, M Bossut, M.D. Beuckeleer, and Jan Leemans. (1992). Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. The Plant Cell, 4 :1495-1505.

Marie-Francoise J, A Souvre, M. Beckert, and Gilbert Alibert. (1995). Optimaisation of DNA transfer and transient β-glucuronidase expression in electroporated maize (*Zea mays* L.) microspores.Plant Cell Reports, 15 : 55-58.

Parker. W.B., Somers, D.A., Wyse, D.L., Keith, R.A., Burton, J. D., Gronwald, J.W. and B.G. Gengenbach. 1990. Selection and characterization of sethoxydim-tolerant maize tissue culture . Plant Physiol. 92 :1220-1225.

Pareddy, D.R., R.I. Greyson and D.C. Walden. 1987. Fertilization and seed production with pollen from in-vitro cultured maize tassel. Planta. 170: 141-143

Potrykus, I., C.T. Harms, H. Lorz and E. Thomas. (1977). Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.). Mol. Gen. Genet, 156: 347-350.

Saleem, M. And A.J. Cutler. 1987. Stabilizing corn leaf protoplast with n-propyl gallate. J. Plant. Physiol. 128: 479-484.

Sukhapinda K., M.E. Kozuch, B. Rubin-Wilson, W.M. Ainley, and D.J. Merlo. 1993. Transformation of maize (Zea mays L.) protoplasts and regeneration of haploid transgenic plants. Plant Cell Reports. 13: 63-68.

Sun, C.S., L.M. Prioli and M.R. Sondahl. 1989. Regeneration of haploid and dihaploid plants from protoplasts of super sweet (sh2 sh2) corn. Plant cell Reports. 8: 313-316.

Vasil, V. and I.K. Vasil. .1987. Formation of callus and somatic embryos from protoplasts of a commercial hybrid of maize (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet. 73: 793-78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Welter M.E., D.S. Clayton, M.A.. Miller, and J.F. Petolino. 1995. Morphotypes of friable embryogenic maize callus .Plant Cell Reports. 14 :725-729

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้