สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย้ายยีนในข้าวเหนียวโดยอโกรแบคทีเรียม

นายเทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ รหัส 41053023
นายธำรงค์ เงาภู่ทอง รหัส 41053025

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43967
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

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

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gene transformation of rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium* sp.

Therdsak Prathomwong 41053023

Thomrong Ngaophuthong 41053025

A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การย้ายยีนในข้าวเหนียวโดยอโกรแบคทีเรียม

Gene transformation of rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium* sp.

โดย นายเทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ รหัสประจำตัว 41053023

นายธำรงค์ เงาภู่ทอง รหัสประจำตัว 41053025

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....

(ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

.....

(ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) กรรมการ

.....

(อ. พนา โลหะทรัพย์ทวี) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การย้ายยีนในข้าวเหนียวโดยอโกรแบคทีเรียม
นักศึกษา นายเทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ รหัส 41053023
นายธำรงค์ เงาภู่ทอง รหัส 41053025
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การชักนำเอ็มบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้กลายเป็นแคลลัสโดยใช้ฮอร์โมน NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าอาหารแข็ง NB ที่มีฮอร์โมน NAA ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเอ็มบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด

การย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 และใช้สารชักนำคือ อะซิโตไซลิงโกน ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากผลการทดสอบกัสพบว่า ผลของการย้ายยีนจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของข้าว สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และอายุของแคลลัส ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวเหนียวดำคือ เชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และอายุของแคลลัส 5 วัน และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวเหนียวสันป่าตองอายุแคลลัส 10 สัปดาห์คือ เชื้ออโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 และความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project title	Gene transformation of rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium* sp.
Name	Mr. Terdsuk Prathomrong 41053023
	Mr. Thomrong Ngaophuthong 41053025
Special project advisor	Assistant Prof. Anurug Poeaim
Department	Applied biology
Academic	2001

Abstract

The results of induction mature seeds into callus on NB medium containing hormone NAA at different concentration level found that 1.0 mg/l NAA suitable for Black Sticky rice.

Gene transfer into callus 3, 5 and 7 days by *Agrobacterium* sp. three strains AGL-1, EHA105 and LBA4404 and using 50 and 100 μM acetosylingone. From the gus assay showed the results of gene transfer was different in which kind of rice, strains of *Agrobacterium* sp. concentration of acetosylingone and age of callus. The higest efficiency in gene transfer of Black Sticky rice were callus 5 days, EHA105 and 100 μM acetosylingone and The higest efficiency in gene transfer of 10 weeks Sunpatong rice were EHA105 and 100 μM acetosylingone.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม และ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ที่เป็นคณะกรรมการในโครงงานพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษแบบนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นายเทิดศักดิ์ ประถมวงศ์
นายธำรงค์ เงาภู่ทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาคภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาคภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลอง	22
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างการย้ายยีนในพืชโดยใช้เครื่องยิงยีน (Particle gun bombardment)	12
2	การพัฒนาการย้ายยีนในข้าว	14
3	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการใช้เครื่องยิงยีน	15
4	ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 3 สูตร	20
5	แสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเลี้ยงในสูตรอาหารแข็งสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 14 วัน	23
6	แสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเลี้ยงในสูตรอาหารแข็งสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 21 วัน	24
7	แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน	29
8	แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน	31
9	แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน	32
10	แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* ในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองอายุ 10 สัปดาห์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์	34
11	แสดงผลการทดสอบความต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี ของข้าวเหนียวดำ	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	แสดงอาหารสูตร NB	42
2	อาหารเหลว LB (LURIA-BERTANI)	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภูมิแท่งแสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เกิดแคลลัสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 ระยะเวลา 14 วัน	23
2	แผนภูมิแท่งแสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เกิดแคลลัสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 ระยะเวลา 21 วัน	25
3	แผนภูมิแท่งแสดงการเปรียบเทียบผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เกิดแคลลัสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 ระยะเวลา 14 และ 21 วัน	26
4	แคลลัสของข้าวเหนียวดำที่เจริญบนอาหารสูตร NB_3 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	27
5	การตรวจสอบการย้ายยีนในแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ	28
6	แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน	30
7	แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน	31
8	แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน	33
9	แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองอายุ 10 สัปดาห์	35
10	การตรวจสอบการย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB_3 เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยดูจากการปรากฏสีน้ำเงินบนแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ	37
11	ต้นข้าวเหนียวสันป่าตองจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 รีเจเนอเรชันเป็นเวลา 10 เดือน	37
12	ลักษณะโครงสร้างของพลาสมิดแบคทีเรีย *Agrobacterium* (Ti plasmid)	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าว คือ ธัญญาหารที่มีความสำคัญต่อมนุษย์และสัตว์มาก ประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักโดยเฉพาะชนชาวเอเชีย วิถีชีวิตคนไทยตั้งแต่ครั้งอดีตผูกพันกับข้าวซึ่งเป็นผลิตผลที่หล่อเลี้ยงประเทศไทยมาแต่ครั้งโบราณจนถึงปัจจุบัน ประชาชนคนไทย (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก เฉลี่ยบริโภคคนละประมาณ 130 กิโลกรัมต่อปี ดังนั้นคนไทยทุกคนจึงให้ความสำคัญในคุณค่าของข้าวตลอดมา

ข้าวปลูกมากในเอเชียและใช้บริโภคในเอเชียประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ข้าวที่ปลูกสำหรับบริโภคทั่วโลกมี 2 ชนิด จำนวนมากกว่า 120,000 พันธุ์ คือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และข้าวปลูกแอฟริกา (*O. glaberrima* Steud.) นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาข้าวชนิดต่าง ๆ พบว่าข้าวพวก *Oryza sativa* ยังแบ่งได้อีก 3 กลุ่มคืออินดิคา จาปอนิคาและจาวานิคา โดยยึดเอาลักษณะภายนอกของต้น เมล็ด และเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ลีบของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวทั้ง 3 ชนิดเป็นเกณฑ์ในการแบ่งดังนี้

อินดิคา เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ต้นสูงและอ่อน มีใบกว้างสีเขียวอ่อน แตกกอมาก ให้ผลผลิตต่ำ มีการตอบสนองต่อปุ๋ยน้อย แต่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ง่าย ปลูกมากในประเทศเขตร้อนเช่น อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และไทย

จาปอนิคา ลักษณะเมล็ดป้อมสั้น ต้นเตี้ยและแข็ง ใบแคบสีเขียวแก่ การแตกกอปานกลาง ให้ผลผลิตสูง มีการตอบสนองต่อปุ๋ยดีมาก ปลูกในพื้นที่อบอุ่นเช่น จีนเกาหลี ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา

จาวานิคา เมล็ดกว้างหนา ใบกว้าง และแข็งสีเขียวแก่ แตกกอน้อย พบในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น และเป็นข้าวที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ข้าวในกลุ่มอินดิคา มีปัญหาที่สำคัญของการปลูกข้าวคือให้ผลผลิตต่ำ ซึ่งเกิดจากโรคและแมลงเข้าทำลาย โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัส จึงได้มีความพยายามที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรพบุรุษไทยได้ใช้ภูมิปัญญาคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมเพื่อผลิตที่ดี และคุณภาพเมล็ดข้าวที่ดี ดังเช่นพันธุ์ข้าวปิ่นแก้ว ซึ่งเคยชนะในการประกวดพันธุ์ข้าวโลกเมื่อปี พ.ศ. 2476 การพัฒนาพันธุ์ข้าวได้เริ่มจริงจังในสมัยรัชกาลที่ 5 กรุงรัตนโกสินทร์ จากความเจริญรุ่งเรืองของประเทศสมัยนั้น ทำให้มีการติดต่อค้าขายกับต่างประเทศมากขึ้น พระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว ได้ทรงพิจารณาเห็นว่า ข้าวกำลังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญแต่ข้าวไทยกลับมีราคาต่ำ การค้าข้าวที่มีมาตั้งแต่สมัยอยุธยานั้นเข้าใจว่าไม่มีการคัดแยกข้าวเมล็ดสั้นออกจากข้าวเมล็ดยาว หรือแยกข้าวนาสวนออกจากข้าวนาเมือง ซึ่งจากการที่ไทยส่งข้าวทั้งเมล็ดสั้นและเมล็ดยาวปนกันออกไปขาย ทำให้มีผู้ซื้อแล้วนำไปคัดแยกเอาข้าวเมล็ดยาวขายเป็นข้าวคุณภาพดีของอินเดียที่มีชื่อเสียงในตลาดโลกขณะนั้น (ข้าวปาฐุนา หรือ Patna rice) ส่วนเมล็ดข้าวสั้นที่เหลือก็ขายในชื่อข้าวไทย (Siam rice) ซึ่งทำให้ภาพพจน์ข้าวไทยเสียหายอย่างยิ่ง พระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัวจึงทรงโปรดให้มีการประกวดพันธุ์ข้าวขึ้นเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2450 โดยทรงกำหนดวัตถุประสงค์ "เพื่อเป็นการอุดหนุนและบำรุงหาพันธุ์ข้าวที่ดีมาไว้ทำพันธุ์ และเพื่อให้ข้าวประเทศสยามเจริญดี มีค่าเท่าเทียมกับข้าวของประเทศอื่น" ส่งผลให้ชาวนาหันมาสนใจปลูกข้าวพันธุ์ดีกันมากขึ้น ในหลาย ๆ ปีที่ผ่านมาได้มีการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวให้เกิดพันธุ์ข้าวใหม่ ๆ สามารถต้านทานโรคพืชต่าง ๆ ได้ดี และมีคุณภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณข้าวได้จำนวนมากเพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ ปัจจุบันมีพื้นที่ที่ปลูกข้าวปีละประมาณ 63 ล้านไร่ (นาปีและนาปรัง) ได้ผลผลิตข้าวเปลือกประมาณ 22 ล้านตัน (สงกรานต์, 2544) และยังได้ทำการพัฒนาประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มผ่านดีเอ็นเอโดยตรงในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว กรรมวิธีนี้ก็ยังประสบปัญหาต่าง ๆ เช่น วิธีการมีประสิทธิภาพต่ำและไม่เป็นไปตามที่คาดไว้รวมทั้งความยุ่งยากในการย้ายยีน หลาย ๆ ปีที่ผ่านมาการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่มีประสิทธิภาพสูง ในปัจจุบันมีรายงานมากมายที่เขียนถึงความสำเร็จโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียมในการย้ายยีนเข้าสู่ธัญญาพืช (Chan และคณะ 1992, Hiei และคณะ 1997) วิธีที่ใช้ในปัจจุบันที่มีประสิทธิภาพสูงคือการใช้เครื่องยิงยีน (Particle gun bombardment) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยวิธีการนี้สามารถทำการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้มีประสิทธิภาพมากกว่าในอดีตที่ผ่านมา โดยอาศัยการส่งสารพันธุกรรมที่เคลือบอยู่บนผิวของผงทังสเตน หรือทองคำ ด้วยแรงดันของก๊าซฮีเลียมเข้าไปยังเซลล์ผู้รับ (Takashi, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวเหนียวสายพันธุ์สันป่าตองและข้าวเหนียวดำให้กลายเป็นแคลลัส
2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สำหรับการย้ายยีน
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน หลังการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์
4. ศึกษาความต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี
5. ศึกษาการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้น

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เกิดเป็นแคลลัส และนำมาทำการย้ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* แล้วจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรโมเตอร์ยีนหลังจากการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยการตรวจสอบยีนกัส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตองและข้าวเหนียวดำให้กลายเป็นแคลลัส
2. ทำให้ทราบปัจจัยที่เหมาะสมในการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในการย้ายยีนเข้าสู่เซลล์ข้าว
3. สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปสานต่องานทางด้านพันธุวิศวกรรมให้ครบวงจร เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ข้าวเป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในตระกูลหญ้า (Family : Gramineae หรือ Poaceae) สกุล ออไรซ่า (Genus : *Oryza*) ข้าวเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและอบอุ่น มีการแพร่กระจายตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 53 องศาเหนือ ถึง 35 องศาใต้ และสามารถขึ้นได้ดีตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงประมาณ 2,500 เมตร เนื่องจากข้าวมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางจึงพบข้าวชนิดต่าง ๆ ซึ่งปัจจุบันมีทั้งหมด 23 ชนิด เป็นข้าวที่ปลูกเพื่อบริโภค 2 ชนิด ส่วนที่เหลือเป็นข้าวป่าทั้งหมด

ประเทศไทย-ศูนย์กำเนิดข้าว

ความหลากหลายของข้าวชนิดต่าง ๆ ที่แพร่กระจายทั่วโรคมีอย่างน้อย 23 ชนิด ในจำนวนนี้มีเพียง 2 ชนิด ที่มนุษย์ใช้ปลูกเพื่อบริโภค คือข้าวเอเชีย และข้าวแอฟริกา ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากและมีจำนวนประมาณอย่างน้อย 120,000 พันธุ์ที่มีชื่อและลักษณะต่างกัน

ประเทศไทยอยู่ในเขตความผันแปรของข้าวป่าและข้าวปลูก มีข้าวป่าแพร่กระจายทั่วประเทศ 5 ชนิด ในจำนวนนี้มีชนิดที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชียคือ ข้าวป่าข้ามปี (*O.rufipogon* Griff.) และข้าวป่าปีเดียว (*O.nivara* Shama et. Shastry) ประเทศไทยนอกจากจะมีความหลากหลายในชนิดของข้าวแล้วยังมีความหลากหลายในพันธุ์ข้าวป่าอีกด้วย ประมาณอย่างน้อย 3,500 ชื่อที่มีลักษณะต่างกัน ปัจจุบันสถาบันวิจัยพันธุ์ข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกและข้าวป่าของไทยได้มากกว่า 19,000 ตัวอย่าง พบว่าอย่างน้อย 5,500 ตัวอย่างมีชื่อข้าวปลูกต่างกัน ลักษณะที่เห็นได้ชัดคือ ลักษณะข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวอายุเบา กลาง และอายุหนัก เป็นต้น ซึ่งภายในแต่ละลักษณะก็ยังมีความหลากหลายอีก เช่นมีปริมาณอะไมเลสต่างกัน เป็นสาเหตุให้หุงสุกและนุ่ม แข็งหรือเหนียว จากความหลากหลายในพันธุกรรมที่พบในข้าวป่าที่เป็นบรรพบุราของข้าวปลูกตลอดจนความหลากหลายของพันธุกรรมข้าวปลูกที่พบจำนวนมากในประเทศไทยนี้ จึงเป็นที่ยอมรับว่าประเทศไทยเป็นศูนย์กำเนิดและแพร่กระจายของข้าวเอเชีย (สงกรานต์, 2544)

พันธุ์ข้าวของเกษตรกร

จากการที่ทางราชการได้จัดให้มีการประกวดพันธุ์ข้าวขึ้นภายในประเทศ และได้จัดส่งพันธุ์ข้าวทั้งของนาทดลองและเกษตรกรจากภาคต่าง ๆ ไปประกวดในระดับโลกและได้รับรางวัลกลับมาถึง 11 รางวัลนั้น ทำให้เกษตรกรให้ความสนใจในการที่จะบำรุงรักษาและคัดเลือกพันธุ์ข้าวในนาของตนให้ดี บริสุทธิ์ สม่ำเสมอ ทำให้ได้พันธุ์ข้าวที่ปลูกแล้วได้ผลผลิตสูงและคุณภาพเมล็ดดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีชื่อเสียงทำให้มีการตั้งชื่อพันธุ์ข้าวตามชื่อผู้บำรุงพันธุ์ที่เรียกกัน อาจจะเรียกตามลักษณะของสีเปลือกตามด้วยชื่ออื่น ๆ เช่น เหลืองอ่อน ขาวภูดาษ ขาวทดลอง ตามลักษณะคุณภาพและการให้ผลผลิต เช่น ดอกมะลิ ขาวพวง เกวียนหัก ล้นยุง เรียกชื่อคล้ายผลไม้หรือดอกไม้ที่นิยม เช่น น้ำดอกไม้ จำปาซ้อน ขาวดอกมะลิ เรียกชื่อตามแหล่งที่มา หรือชื่อต่าง ๆ ที่เป็นมงคลพันธุ์ข้าวที่น่าจะบำรุงและคัดเลือกพันธุ์ โดยเกษตรกรที่ยังรู้จักคุ้นเคยกันในสมัยนี้ ได้แก่ ขาวตาแห้ง ส่วนพันธุ์ข้าวที่ปรับปรุงพันธุ์ที่นาทดลอง และมีพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรเรียกกัน เช่น ขาวยิ่งศักดิ์ หรือพันธุ์ข้าวที่บำรุงพันธุ์ในเกษตรกรรายอื่น ๆ เช่น ขาวตาอู๋ หอมตาเกิด เหลืองตาแพ ขาวตาแพง เหลืองแม่รำพึง ขาวตาก้อง ขาวแม่วงษ์ เหลืองยายหนู ขาวตาเฮง ขาวนางขวด และเหลืองตาสังข์ ปัจจุบันไม่พบมีการปลูกอยู่เลย การประกวดพันธุ์ข้าวเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการรวบรวมพันธุ์ข้าวจากเกษตรกรในท้องถิ่นต่างๆ ในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่ดีเด่นได้ตามหลักวิชาการ(สงกรานต์,2544)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว : พัฒนาการอย่างต่อเนื่อง

จากปัญหาเรื่องการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในปี พ.ศ. 2533-34 และหวนกลับมาระบาดอีกครั้งในปี พ.ศ. 2540-2541 (อภิชาตและคณะ, 2544) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในระยะหลังโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าวนาชลประธาน ได้เน้นพันธุ์ที่ต่อต้านต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นวัตถุประสงค์สำคัญ ซึ่งมีผลงานต่อเนื่องจากการรับรองพันธุ์ข้าวเจ้าสุพรรณบุรี 90 คือ พันธุ์ข้าวชัยนาท 1 แพร่ 1 สุพรรณบุรี 1 และสุพรรณบุรี 2 และจากอัตราการขยายตัวของปริมาณการส่งออกข้าวหอมไปต่างประเทศ ทำให้นโยบายการส่งออกข้าวคุณภาพดีมากขึ้น โดยเน้นการผลิตข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 15 สถาบันวิจัยข้าวจึงได้เสนอให้มีการรับรองพันธุ์ข้าวหอมที่ไม่ไวต่อช่วงแสงสำหรับปลูกในพื้นที่ที่มีชลประทานจำนวน 2 พันธุ์ จากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวคุณภาพดีเพื่อการส่งออกคือ พันธุ์ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี

นั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงมีเป้าหมายสูงสุดที่จะสร้างพันธุ์ข้าวที่รวมลักษณะต่าง ๆ ไว้อย่างสมบูรณ์ที่สุด และสามารถแก้ปัญหาต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง การปรับปรุงพันธุ์จึงเป็นงานที่ต้องดำเนินการอย่างต่อเนื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศในทุกด้าน โดยเฉพาะด้านการเกษตร เนื่องจากข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญที่สุดสำหรับประชากรโลก ดังนั้นจึงได้นำความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพใช้เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตข้าวโดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีชีวภาพของพืชมีความก้าวหน้าช้ากว่า จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียและยีสต์ทั้งนี้สาเหตุมาจากพืชมีพื้นฐานสรีรวิทยาและพันุกรรมที่ซับซ้อนกว่าจุลินทรีย์มาก การนำเทคโนโลยีของยีน หรือพันธุวิศวกรรมมาแทนที่การผสมพันธุ์แบบเดิม (conventional breeding) นั้นเป็นการเพิ่มผลผลิตได้มาก เช่นการใช้การปรับปรุงประสิทธิภาพของปุ๋ยและการสังเคราะห์แสง ทนหรือต้านทานต่อโรคพืชและยาปราบวัชพืช ทนต่อดินเค็ม เป็นต้น อีก 10 ปี ข้างหน้า (พ.ศ. 2551) เทคโนโลยีชีวภาพจะแสดงให้เห็นศักยภาพที่โดดเด่นไปทั่วโลก ข้อมูลสนับสนุนคำพูดดังกล่าวก็คือการใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (plant tissue culture) ที่ทำกันมาเป็นเวลานานทั้งประเทศและนานาชาติ ในประเทศไทยเรารู้จัก ศาสตราจารย์ศาลระพี สาคริก (อภิชาตและคณะ, 2544) ซึ่งเป็นผู้บุกเบิกเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มากกว่า 30 ปี (ตั้งแต่ พ.ศ. 2505) ในต่างประเทศเรื่องของพันธุวิศวกรรมของพืชมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1986 (Fraley และคณะ, 1986) นักวิจัยใช้เทคนิคดังกล่าวผลิตสารทรงคุณค่า ชิโคนิน (shikonin) ซึ่งปกติราคากิโลกรัมละ 200,000 บาท (5,000 เหรียญสหรัฐ) ได้สำเร็จ ล่าสุดได้มีการทำพันธุวิศวกรรมในมะเขือ และได้รับการอนุญาตให้ใช้ได้ในอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2539 เราเรียกพืชเหล่านั้นว่า พืชทรานส์จีนิค (transgenic plant)

เทคนิคพันธุวิศวกรรมสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ (อภิชาต และคณะ, 2544)

1. การใช้ cloning vector มี 2 ชนิดคือ ไวรัส และ Ti (tumor-inducing) plasmid จากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืชเรียกว่า *Agrobacterium tumefaciens* โดยทำให้เกิดโรคหงอนไก่ (crown gall disease) เป็นตัวพาสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์โดยมีเอนไซม์โอพีนและออกโตพีนเข้ามาเกี่ยวข้อง

2. Particle bombardment technique ใช้ถ่ายทอดพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่บางชนิด พืชที่ใช้วิธีดังกล่าว ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว ข้าวบาเล่ย์ ถั่วเหลือง และฝ้าย (Vasil และคณะ, 1991 และ Hiei และคณะ, 1997) เทคนิคดังกล่าวจะใช้วิธีการเคลือบบนอนุภาคขนาดเล็กมาก ๆ ในสภาพที่เป็นสูญญากาศและจึงจะยิงด้วยความเร็วสูงเข้าสู่เซลล์พืช ยีนสัญลักษณ์ที่ใช้ได้คือ คลอแรมฟีคอล อซีติลทรานสเฟอเรส (chloramphecol acetyltransferase) นีโอไมซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส

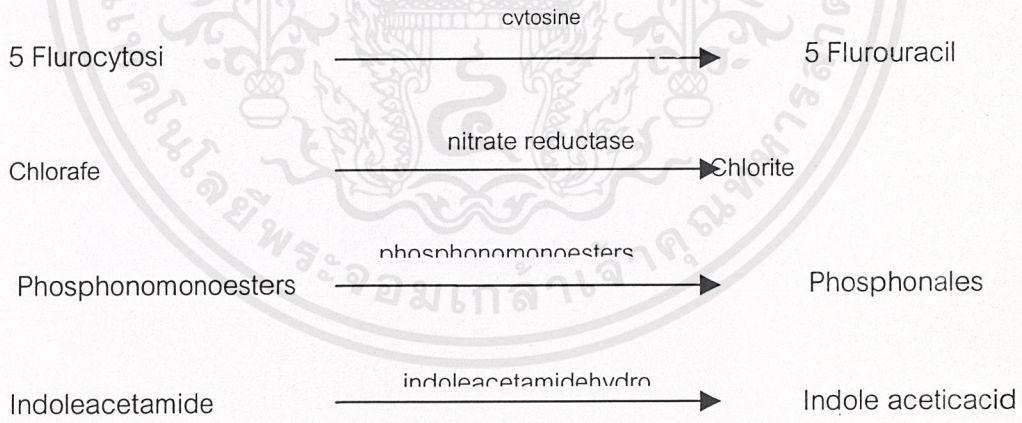
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(neomycin phosphotransferase,NTP II) เบตา-กลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase) และลูซิเฟอ-เรส (luciferase)

3. การคัดเลือกโคลน โดยมากจะมียีนสัญลักษณ์สำหรับช่วยในการคัดเลือก ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้ดังนี้

3.1 การคัดเลือกแบบบวก (Positive selection) โดยเซลล์สามารถเจริญได้ทั้งในสารพิษและสามารถใช้สารที่ปกติไม่มีอาหารเลี้ยงพืช ในกรณีสารพิษ ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะเอนไซม์ย่อยสลายยาปราบวัชพืช ได้แก่ นีโอไมซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส (neomycinphosphotransferase ,NTP II) หรือร่วมกับ กานาไมซิน (kanamycin) พาโรโมไมซิน (paromomycin) หรือยาปฏิชีวนะอื่น ๆ ในกรณีที่สองยีนที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทนต่อพวกไกลโฟเสท (glyphosate) ที่เรียกว่า 5-อีโนอิลไพรูวิล ชิคิเมททีฟอสเฟต ซินเทส (5-enoylpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) หรือฟอสโฟแมนโนไอโซเมอเรส (phosphomannoisomerase,PMI) หรือฟอสโฟไซโลไอโซเมอเรส (phosphoxyloisomerase,PXI) ซึ่งสามารถเจริญได้บนแมนโนสหรือไซโลส ซึ่งเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์

3.2 การคัดเลือกแบบลบ (Negative selection) ผลผลิตที่ได้ไปกระตุ้นโปรทอกซิน (protoxin) ให้เป็นสารพิษและทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง เช่น



4. ใช้ promoter sequence translation leaders introns และ polyadylation singnals ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและคู่ เพื่อให้ได้การแสดงออกของพืชในได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยนิยมใช้ cauliflower mosaic virus (CaMV) (ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคใบด่างของดอกกระหล่ำ) โดยใช้ CaMV 35S promoter ซึ่งจัดเป็น contitutive promoter ถูกนำมาใช้เป็นโปรโมเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่หลาย ๆ ชนิด นอกจากนี้ยังมี CaMV 19S,35S ของ Figwott

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mosaic Carnation Etch และ Peanut Mottel viruses การแสดงออกทางเคมีและฟิสิกส์ก็สามารถนำมาใช้ได้ เช่นในทางฟิสิกส์ ใช้แสงและอุณหภูมิเป็นตัวกระตุ้น ทางเคมีใช้สารประเภท safeners ซึ่งจะคอยป้องกันพืชไม่ให้ได้รับอันตรายจากสารฆ่าแมลงและทั้งประเภทยาฆ่าวัชพืช (herbicide) หรือ ยาฆ่ารา (fungicide) ซึ่งสารประเภท safeners ที่ใช้กระตุ้น promoter ได้จากยีนที่ควบคุมเอนไซม์ที่ลดความเป็นพิษ เช่น glutathione-S-transferase (GSTs) หรือcytochrome P-450 อย่างไรก็ตามยังต้องค้นคว้าและวิจัยหาตัวกระตุ้นที่น่าเชื่อถือได้รวดเร็วให้ได้ในอนาคต นอกจาก promoter แล้ว ยังมีรายงานหลายฉบับ ได้กล่าวถึงยีน translation leaders introns โดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว introns ของ ubiquitin เอนไซม์แอลกอฮอลล์ดีไฮโดรจีเนส และ hsp 70 ส่วน polyadenylation signal ของเอนไซม์ nopaline synthase (NOS) จากอโกรแบคทีเรียมที่นิยมใช้ จากการรวบรวมข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่ายีนสำหรับการควบคุมการถอดรหัสควรจะมีการศึกษาและปรับปรุงให้ดีขึ้นในอนาคตเนื่องจากปัจจัยการถอดรหัสล้วนต้องใช้ความรู้ทางด้านเคมีร่วมด้วยเพื่อให้ได้ promoters ที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งจัดเป็นงานที่นักเทคโนโลยีชีวภาพพืชควรกระทำเป็นอย่างยิ่ง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีการย้ายยีน

วิธีการย้ายยีนที่ถูกใช้กันอยู่อย่างแพร่หลาย มีประสิทธิภาพสูงและประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด คือการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม จากการอาศัยความสามารถในการส่งย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อเข้าสู่เซลล์พืช เข้าเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของจีโนม สามารถเกิดการแสดงออกได้ ต่อมามีการพัฒนากลไกการส่งย้ายยีนของเชื้ออโกรแบคทีเรียมมาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการส่งย้ายยีนควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าสู่พืช ในข้าววิธีการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมได้ถูกนำมาใช้ แต่พบอุปสรรคที่สำคัญคือ ความต้านทานของข้าวต่อเชื้ออโกรแบคทีเรียม เนื่องจากข้าวไม่เป็นพืชอาศัยของเชื้ออโกรแบคทีเรียมตามธรรมชาติ ทำให้การย้ายยีนมีประสิทธิภาพต่ำ จึงมีการพัฒนาวิธีการย้ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียมให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในหลาย ๆ ปัจจัย ในปัจจุบันการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียมได้ถูกนำมาใช้ในการย้ายยีนเข้าสู่ข้าวชนิดจาปอนิคา ได้ประสบความสำเร็จในหลาย ๆ สายพันธุ์ ขณะที่ข้าวชนิดอินดิคา เช่นข้าวไทย ยังตอบสนองต่อการย้ายยีนต่ำอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้ออโกรแบคทีเรียม

อโกรแบคทีเรียมเป็นสาเหตุของโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน เชื้อตัวนี้เข้าทำลายพืชตรงรอยต่อระหว่างผิวดินกับอากาศ อาการที่แสดงให้เห็นคือปุ่มปมที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่งดังกล่าวเรียกชื่อโรคนี้ว่าโรคปุ่มปม เมื่อนำส่วนปมที่แสดงอาการของโรคมาตรวจสอบปรากฏว่าไม่พบเชื้อแต่อย่างใด และเมื่อนำสารที่สกัดได้ไปเพาะเชื้อให้กับพืชก็ไม่มีอาการเช่นเดียวกันแต่เมื่อเพาะเชื้อด้วยอโกรแบคทีเรียมบริเวณคอดินสามารถก่อให้เกิดโรคปุ่มปมได้ และเมื่อนำดินบริเวณที่เกิดอาการโรคมาตรวจแยกเชื้อสาเหตุปรากฏว่ามีเชื้ออโกรแบคทีเรียมอยู่ จึงสันนิษฐานว่าเชื้อสาเหตุตัวนี้ไม่ได้เข้าไปอยู่ในชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการโรค แต่อาจปล่อยบางสิ่งบางอย่างเข้าไป ซึ่งในเวลาต่อมาพบว่าแบคทีเรียปล่อยข้อมูล พันธุกรรมเข้าสู่เซลล์พืช แล้วบังคับให้เซลล์พืชสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโร ผลที่ตามมาคือเซลล์พืชแบ่งตัวอย่างรวดเร็วมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเห็นปุ่มปม นอกจากนี้แบคทีเรียยังบังคับให้พืชสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย สารดังกล่าวเป็นพวกกรดอะมิโนกลุ่มที่เรียกว่า โอพีน (opine) ที่สำคัญได้แก่ ออคโทพีน (octopine) และโนพาลีน (nopaline) เป็นต้น

ปัญหาสำคัญของการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียม ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ อโกรแบคทีเรียมจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชที่จะเข้าบุกรุกในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งส่วนมากเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจไม่ได้เป็นพืชอาศัยของเชื้ออโกรแบคทีเรียม ทำให้การย้ายยีนมีประสิทธิภาพต่ำ มีสาเหตุสำคัญคือ ลักษณะทางกายภาพของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่มีความแตกต่างกันทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีนของเชื้ออโกรแบคทีเรียม จะตอบสนองต่อสารประกอบ ฟีโนลิก เช่น อะซีโตไซลิงโกน ที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผลในการเข้าบุกรุกของเชื้อ บาดแผลที่เกิดขึ้นในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะไม่มีการสร้างสารฟีนอลิกขึ้น หรือมีแต่การสร้างในปริมาณน้อย ส่งผลให้ประสิทธิภาพการบุกรุกของเชื้ออโกรแบคทีเรียมต่ำลง รวมทั้งเซลล์ที่เกิดบาดแผลไม่แสดงการแบ่งตัวเหมือนในพืชใบเลี้ยงคู่ จึงมีการพัฒนาวิธีการย้ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว โดยใช้อโกรแบคทีเรียมให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในหลายๆปัจจัย ได้แก่ การเลือกเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ตอบสนองต่อการย้ายยีนสูงมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย การปรับสภาพของการย้ายยีนให้เหมาะสมต่อการบุกรุกของอโกรแบคทีเรียม โดยการเติมสารฟีโนลิกเช่นเดียวกับสารที่เซลล์พืชปล่อยออกมาขณะเกิดบาดแผล (อภิชาต และคณะ, 2544)

การย้ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

จากการศึกษาพบว่า *Agrobacterium tumefaciens* เป็นสาเหตุโรคพืชที่ไม่ได้บุกรุกเข้าสู่เซลล์พืช กลไกการเกิดโรคเป็นผลมาจากปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับพืช และก่อให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดอาการที่เรียกว่าปุ่มปม จึงคิดว่าแบคทีเรียตัวนี้น่าจะมีศักยภาพในการเป็นพาหะ ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียกำหนดทิศทางการแบ่งเซลล์ของเซลล์พืชแล้วบังคับให้พืชสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวตรวจสอบการปลดปล่อยดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชได้

ค.ศ. 1998 Vain และคณะได้ทำการศึกษาการย้ายยีนในข้าวโดยใช้โปรตีนที่สะท้อนแสงสีเขียวเป็นยีนเครื่องหมาย

ค.ศ. 1998 Balconi และคณะได้ทำการศึกษาการย้ายยีนในข้าวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยการเพาะเลี้ยงแบบอิตาเลียนพบว่าสายพันธุ์ของ *Agrobacterium* sp. และชนิดของยีนในแคลลัสของข้าวมีผลต่อเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์

ค.ศ. 2000 Yin และคณะได้ทำการศึกษาหลักฐานของรูปแบบเชิงซ้อนของ T-DNA ในการย้ายยีนในข้าว

ค.ศ. 2001 Salas และคณะได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของ T-DNA เซลล์พืช

ค.ศ. 2001 Urushibara และคณะได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการย้ายยีนของการเพาะเลี้ยงข้าวในอาหารเหลวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

การใช้อโกรแบคทีเรียมเป็นตัวกลางในการย้ายยีนในข้าวอินดิคาโดยการใช้เวกเตอร์แบบ binary และ superbinary ปัจจุบันนี้มีการใช้อโกรแบคทีเรียมในการย้ายยีนอย่างกว้างขวาง ซึ่งการใช้อโกรแบคทีเรียมนี้จะให้ประสิทธิภาพสูง อโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมี superbinary vector ให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ binary vector (pCAMBIA1301) โดยทั้งสองกรณีสามารถผลิตพืชที่ต้านทานไฮโกรไมซินได้ถึง 60 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดสอบกัส (GUS) เป็นบวกถึง 59 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายยีนจึงมีการใช้อะซิโตไซลิงโกน (ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์) (Urashibara และคณะ, 2001

การย้ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีน

เครื่องยิงยีนเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการนำยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์ วิธีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย John Sanford และคณะ มหาวิทยาลัย Cornell สหรัฐอเมริกา ซึ่งอาศัยการส่งพาหะที่ห่อหุ้มด้วยดีเอ็นเอเข้าไปในเนื้อเยื่อและเซลล์โดยตรง เครื่องยิงยีนนี้จะถูกใช้เมื่อการย้ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* sp. ล้มเหลวหรือเกิดความล้มเหลวในการรวมโพรโทพลาสต์ (protoplast fusion)

เครื่อง gunpowder driven particle gun ซึ่งเป็นเครื่องยิงยีนรุ่นแรกๆซึ่งใช้ผงทังสเตนที่เคลือบด้วยสารพันธุกรรมโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ไมโครเมตร ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายในของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลวในปริมาณเล็กน้อยและอยู่ที่ด้านหน้าสุดของหัวกระสุน plastic macroprojectile จะถูกส่งออกไปโดยการอัดประจุไฟฟ้าของดินปืน macroprojectile ที่ถูกส่งออกไปจะไปกระทบกับ plastic stopping plate ที่บริเวณตอนปลายของ acceleration tube โดย macroprojectile จะเคลื่อนผ่านออกทางรูเล็กๆบริเวณปลายท่อ สุดท้าย microprojectile จะถูกดันออกมาแม้ว่ารูปแบบของ - gunpowder driven particle gun นี้จะถูกสร้างขึ้นมาสำเร็จสำหรับใช้เคลื่อนย้ายยีนในพืชหลากหลายสายพันธุ์แต่ก็ขาดการควบคุมพลังงานของเครื่องยิงยีน ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่ปริมาณของเซลล์ผู้รับได้

รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน คือ PDS-1000/He™ โดยมีบริษัท BIO-RAD เป็นตัวแทนจำหน่ายเครื่อง PDS-1000/He™ ได้ถูกพัฒนาขึ้นให้มีประสิทธิภาพดีกว่าเครื่อง gunpowder driven particle gun ภายใต้พื้นฐานการออกแบบที่พัฒนาขึ้นโดย John Sanford และคณะ เครื่อง PDS-1000/He™ ใช้พลังจากแรงอัดของก๊าซฮีเลียม โดยก๊าซนี้จะทำการส่ง macrocarrier เข้าสู่เซลล์ผู้รับ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่อง gunpowder driven particle gun พบว่าเครื่อง PDS-1000/He™ มีความสะอาดและปลอดภัยกว่าทั้งยังสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ของการยิงได้ดีอีกด้วย

การกระจายตัวของ microcarrier บนเซลล์ผู้รับซึ่งมีมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการกระจายตัวของ microcarrier ไปยังเซลล์ผู้รับ ก็ยังเป็นไปอย่างนิ่มนวล และมีความคงที่สูงกว่า

John Sanford กล่าวว่าเครื่องยิงยีนมีพื้นฐานกำเนิดมาจากศาสตร์ทางชีววิทยา และศาสตร์ว่าด้วยการเคลื่อนที่ของกระสุนปืน (อภิชาต และคณะ, 2544) วิธีการนี้มีชื่อเรียกต่างๆ กันมากมายหลายชื่อ เช่น microprojectile bombardment, gene gun method, particle acceleration method และอื่นๆ

ตั้งแต่ได้มีการพัฒนาระบบ particle bombardment ก็ได้มีการสร้างเครื่องยิงยีนที่มีความแตกต่างกันมากมายหลายชนิด เช่น ปืนที่ใช้ในการปลดปล่อยกระแสไฟฟ้า(electrically triggered discharge gun) เครื่องยิงยีนที่ใช้ลม (pneumatic particle gun) ก๊าซฮีเลียม ไนโตรเจน เครื่องที่ใช้พลังงานจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide powered devices) และ micro-targeting gun

ต่อมาเครื่องยิงยีนได้ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากสูงสุด คือใช้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ปลอดภัยมีความแน่นอนแม่นยำ และมีราคาต่ำสำหรับใช้ในการส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ผู้รับ แรกเริ่มวิธีการนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อทำการส่งยีนที่สนใจเข้าสู่สารพันธุกรรมทั้งหมดของนิวเคลียส (nuclear genome) ของพืชชั้นสูง (ตารางที่ 1) ซึ่งเนื้อเยื่อที่นำมาทดสอบนั้นรวมไปถึง สารละลายเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(cell suspension) แคลลัส (callus) คัพภะที่ยังอ่อนอยู่ (immature embryos) ไมโครสปอร์ (microspore) และอื่นๆ โดยเซลล์ข้างต้นที่กล่าวมานี้ จะไม่สามารถทำการย้ายยีนได้เลย ถ้าใช้วิธีการนี้

การย้ายยีนในข้าวครั้งแรกเกิดขึ้นโดยนาย Toriyama และคณะ ในปี ค.ศ.1988 ได้มีการใช้วิธีการทำโพรโทพลาสต์ และการย้ายยีนโดยตรง และได้มีการพัฒนาให้วิธีการนี้ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งการพัฒนาการย้ายยีนในข้าวได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 (Christou, 1993)

วิธีการใช้เครื่องยิงยีนในการนำยีนภายนอกเข้าสู่เนื้อเยื่อของข้าว เป็นวิธีการที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ ซึ่งได้มีการทดลองในข้าวสายพันธุ์อินดิคา และจาปอนิคา (Christou, 1993)

วิธีการนี้ยังสามารถใช้ในการย้ายยีนในจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เช่น *B.megaterium* *Pseudomonas syringae* *Agrobacterium tumefaciens* *Erwinia amylovora* *Escherichai coli* และ ยังสามารถที่จะทำให้เกิดการย้ายยีนได้อีกในอวัยวะต่างๆ ได้ เช่น Chloroplast ใน *Chlamydomonas* sp. และในไมโตคอนเดรียของยีสต์ ในปี ค.ศ.1990 Svab และคณะ รายงานว่าสามารถทำการย้ายยีนเข้าไปในเซลล์สัตว์โดยใช้เครื่องยิงยีนได้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของการย้ายยีนในพืชโดยใช้เครื่องยิงยีน (particle gun bombardment)

ชนิดของพืช	เซลล์ผู้รับ	ยีน	อ้างอิง
Tobacco	Suspension cell	*Gus*[a], *npt II*[b]	Klein, T.M.
Soybean	Embryonic axes	*Gus*, npt II	McCabe, D.E.
Papaya	Immature embryo,etc.	*Gus, npt II*	Fitch, M.
Maize	Callus, Suspension cell	*Gus, bar*[c]	Fromm, M.E.
Maize	Suspension cell	*Gus, bar*	Gordon, W.
Populus	Protoplast-derived cell	*Gus, BT*[d]	McCrown, B.H.
Cranberry	Stem section	*Gus,npt II*, BT	Serres, R.
Rice	Immature embryo	*Gus, bar*	Christou, P.
Rice	Immature embryo	*Gus, hpt*[c]	Li, L.
Dendrobium orchid	Protocorm	*npt II*, virus CP[F]	Kuehnle, A.
Oat	Suspension cell	*Gus, bar*	Somers, D.A.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของพืช	เซลล์ผู้รับ	ยีน	อ้างอิง
Wheat	Scutellar tissue	*Gus, bar*	Nehra, N.S.
Wheat	Immature embryo	*Gus, bar*	Altpeter, F.
Phaseolus vulgare	Seed meristem	*Gus, bar*	Russell, D.R.
Turfgrass	Callus	*Gus*	Zhong, H.
Picea glauca	Somatic embryo	*Gus, npt II*	Ellis, D. D.
Sorghum	Immature embryo	*Gus, bar*	Cases, A.M.
Sorghum	Immature embryo	*Gus, hpt*	Hagio, T.
Peanut	Embryo axis	*Gus, bar,* virus CP	Brar, G.S.
Sunflower	Shoot apices	*Gus, npt II*	Knittel, N.
Barley	Immature embryo	*Gus, bar*	Wan, Y.
Barley	Immature embryo	*npt II*	Ritala, A.
Barley	Immature embryo	Virus CP	Hagio, T.
Alfalfa	Cullus	*Gus, npt II*	Pereira, L.F.
Italian ryegrass	Suspension cell	*Gus, hpt*	Ye, X.
Asparagus	Cullus	*Gus, hpt, bar*	Cabrera

a) :*Gus* ; β-Glucuronidase, b) : *npt II* ; Neomycin phosphotransferase II, c) : bar ; (PAT) Phasphinothricin acrtyl transferase,d) : BT ; *Bacillus thuringiensis*,e) :*hpt* ; Hygromycin Phosphotransferase, f) : CP ; Coat protein

ที่มา : Takashi (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 : การพัฒนาการถ่ายยีนในข้าว

ประเภท	ชนิดของเซลล์	วิธีการ	อ้างอิง
Transient	protoplast	PEG	Ou-Lee *et al.*
Stable callus-Japonica	protoplast	PEG	Uchimiya *et al.*
Transgenic Japonica plant	protoplast	Electroporation	Toriyama *et al.*
	protoplast	Electroporation	Zhang *et al.*
	protoplast	PEG	Zhang and Wu
First indica-type rice	protoplast	PEG	Datta *et al.*
Variety-independent method	immature embryos	Bombardment	Christou *et al.*
Agrobacterium transformation	embryo	Agrobacterium	Hiei *et al.*
First successful field trial with a Useful gene (herbicide resistance)	immature embryos	Bombardment	Oard *et al.*

ที่มา : Christou (1993)

ปี ค.ศ.1996 ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีการออกแบบของสหรัฐอเมริกาทำให้เครื่องยิงยีนแบบมือถือได้กำเนิดขึ้น โดยเครื่องยิงยีนแบบมือถือแบบมือถือนี้สามารถหาซื้อได้ง่ายในประเทศญี่ปุ่น เครื่องมือนี้มีชื่อว่า "Helios™ Gene Gun System" โดยบริษัท BIO-RAD เป็นตัวแทนจำหน่ายซึ่งการทำงานของ particle gun จะขึ้นอยู่กับขนาดของเป้าหมาย และขนาดของเป้าหมายก็จะถูกกำจัดด้วย chamber และเนื้อเยื่อของเซลล์ผู้รับก็ต้องอยู่ในสภาวะสูญญากาศในขณะที่ถูกยิง แต่เครื่องยิงยีนแบบมือถือนี้ไม่ต้องใช้สภาวะสูญญากาศ และเซลล์ผู้รับก็สามารถถูกย้ายยีนได้ภายในลำกล้องของตัวเครื่อง เครื่องมือชนิดนี้จึงน่าจะถูกนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายในอนาคต โดยเครื่องมือชนิดนี้ยังสามารถใช้ได้ทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต (*in vitro* และ *in vivo*)

ลักษณะและวิธีการใช้เครื่องยิงยีน

วิธีการนี้กลายเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นอันดับสองรองจากการย้ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* sp. งานวิจัยที่ใช้เครื่องยิงยีนมีเพิ่มมากขึ้นเมื่อการทำโพรโทพลาสต์ล้มเหลวซึ่งเกิดจากการชักนำโพรโทพลาสต์ให้กลายเป็นต้นพืชนั้นค่อนข้างเป็นไปได้ยากและใช้เวลานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย้ายยีนโดยวิธีการนี้มีทั้งข้อดีข้อเสียมากกว่าการใช้ *Agrobacterium* sp. และการย้ายยีนโดยใช้วิธีโพรโทพลาสต์ดังนี้

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการใช้เครื่องยิงยีน

ข้อดี	ข้อเสีย
1.สามารถใช้ได้กับเซลล์และเนื้อเยื่อแทบทุกชนิด	1.เครื่องยิงยีนจะมีประสิทธิภาพในการย้ายยีนที่มีความละเอียดอ่อนต่ำความถี่ในการย้ายยีนโดยใช้วิธีการนี้จะมีความไม่คงที่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ *Agrobacterium* sp. และการทำโพรโทพลาสต์
2.ใช้ภายในระยะเวลาอันสั้นได้ในคราวเดียว	2.ค่าใช้จ่าย 130,000 เยนต่อการยิง 500 ครั้ง
3.วิธีการนี้ไม่ต้องการลำดับ T-DNA โดยปกติแล้วการย้ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* sp. ภายใน Plasmid DNA จะต้องมีลำดับของ T-DNA ซึ่งยีนส่วนนี้จะถูกส่งเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อพืชและ T-DNA นี้จะถูกควบคุมโดยยีน เครื่องยิงยีนจะทำการปลดปล่อยเม็ดอนุภาคที่มี Plasmid DNA เข้าสู่เซลล์ได้ทันที	3.ถ้าจะนำผลผลิตที่ได้ไปใช้ในทางการค้าผู้ทำจะต้องเสียค่าธรรมเนียมให้แก่เจ้าของลิขสิทธิ์
4.วิธีการนี้ต้องการ Plasmid DNA เพียงเล็กน้อยโดยเครื่อง PDS-1000/He™ ต้องการ Plasmid DNA รวมทั้งสิ้นเพียง 0.8 ไมโครกรัมต่อการยิงหนึ่งครั้ง	4.ในการใช้เครื่องต้องมีความละเอียดอ่อนเพราะฉะนั้นผู้ปฏิบัติอาจต้องขอคำแนะนำ
5.การแสดงออกของยีนที่มีอยู่ได้ไม่นาน สามารถตรวจสอบได้ในเวลาไม่กี่วัน ในการตรวจสอบหาความแตกต่างของยีนที่แสดงออกอยู่ได้ไม่นานในเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดี	ข้อเสีย
6.การตรวจสอบผลที่ผิดพลาดจะถูกกำจัดออกไปในกรณีการใช้ Agrobacterium sp. ในการย้ายยีนการตรวจสอบจุดสีฟ้าโดยใช้สาร x-gluc อาจเกิดการผิดพลาดได้เนื่องจากยีนที่สอดใส่เข้าไปใน T-DNA อาจมีความสามารถในการย่อยสลายสารนี้จนเกิดเป็นจุดสีฟ้าขึ้น หรืออีกกรณีหนึ่งคือเชื้อ *Agrobacterium* sp. อาจเกิดการปนเปื้อน	

ในอนาคตอันใกล้ วิธีการนี้จะกลายเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากทั้งทางด้านโมเลกุลและการปรับปรุงพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวไทย ได้แก่
   1.1 ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง
   1.2 ข้าวเหนียวดำ

2. เชื้ออโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ได้แก่
   2.1 AGL-1
   2.2 EHA105
   2.3 LBA4404

3. สารเคมี
   3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร NB
   3.2 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ และสารเปียกใบ (tween 20)
   3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ 2,4-D NAA BAP ไคเนติน และซีเอติน
   3.4 กรดอะมิโน ได้แก่ แอลโพรลีน และเคซีนไฮโดรไลเสท
   3.5 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
   3.6 สารชักนำการย้ายยีน อะซิโตไซลิงโกน
   3.7 สารฆ่าอโกรแบคทีเรียม เซโฟแทกซิน

4. ภาชนะเครื่องแก้ว
   4.1 บีกเกอร์
   4.2 ขวดรูปชมพู่
   4.3 ปิเปตต์
   4.4 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   4.5 จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43967

4.6 แท่งแก้วคน

4.7 กระบอกตวง

4.8 ขวดวัดปรับปริมาตร

4.9 กรวยแก้ว

5. เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร

5.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด

5.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ

5.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

5.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน

5.5 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

5.6 เตาความร้อนและเครื่องกวน

6. มีดผ่าตัด
7. ปากคีบ
8. จุกยางชนิดทนความร้อน
9. อะลูมิเนียมฟอยล์
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. เครื่องเขย่า
12. ไมโครเวฟ
13. ตู้เพาะเชื้อ
14. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
15. พาราฟิล์ม
16. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
17. กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ภาพ
18. ตู้บ่มเชื้อ
19. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์
20. ตู้ปลอดเชื้อ
21. ตู้เย็น
22. เครื่องล้าง (sonicator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23. ช้อนตักสารเคมี
24. ชุดกรองแยกเชื้อ
    - กระบอกฉีด
    - เยื่อกรอง
25. ที่ดูดปล่อยสาร (auto pipette)
26. ทิปขนาดต่างๆ
27. กระบอกพลาสติกต่างๆ ใช้บรรจุแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
28. ถุงมือ
29. ปากกาเขียนแก้ว
30. แปรงล้างขวดและหลอดทดลอง พร้อมน้ำยา
31. อ่างน้ำขนาดใหญ่

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. **ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส**
    1.1 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวเหนียวดำ 200 เมล็ด ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 นาที
    1.2 เทแอลกอฮอล์ทิ้งแล้วฟอกฆ่าต่อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารเปียกใบ (tween 20) 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 150 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่วถึงเป็นเวลา 30 นาที
    1.3 เทสารละลายคลอรอกซ์ออก แล้วล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง
    1.4 ตักเมล็ดข้าวออกจากฟลาสก์ วางเมล็ดข้าวลงบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
    1.5 คีบเมล็ดข้าววางลงบนอาหารแข็งสูตร NB 3 สูตร ซึ่งประกอบด้วย 2,4- D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1.0 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซูโครส 30.0 กรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเสท 0.2 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) จานละ 20 เมล็ด
    1.6 เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส
    1.7 ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากการวัดพื้นที่ของแคลลัสในช่วง 7 วัน และ 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ในสูตรอาหาร NB 3สูตร

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NB_1	0.5
NB_2	0.75
NB_3	1.0

2. **ศึกษาประสิทธิภาพการย้ายยีนโดยเชื้อ** *Agrobacterium tumefaciens*

2.1 หยดสารละลายของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 โดยใช้อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ลงบนแคลลัสของข้าวเหนียวดำอายุ 3 5 และ 7 วัน และแคลลัสข้าวเหนียวสันป่าตองอายุ 10 สัปดาห์

2.2 เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.3 ล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมเซโฟแทกซิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แช่ย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง

2.4 นำแคลลัสที่ล้างแล้วมาวางบนอาหารแข็งสูตร NB ที่มีเซโฟแทกซิน เป็นเวลา 7 วัน

2.5 นำแคลลัสมาตรวจสอบยีนกัสโดยการนำมาแช่ใน Gus-buffer ให้ท่วมแคลลัส

2.6 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.7 ดูด Gus-buffer ออกแล้วเติมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมแคลลัส

2.8 ตรวจสอบผลการย้ายยีนโดยดูการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอโดยแบ่งระดับความชัดเจนของการมองเห็นเป็น 4 ระดับ คือ 0= ไม่สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ, 1= ไม่สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยตาเปล่า, 2= สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยตาเปล่า, 3= สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยตาเปล่าชัดเจน แล้วทำการตรวจผลโดยใช้ชิ้นตัวอย่าง 10 ชิ้นแล้วนับชิ้นตัวอย่างการเกิดสีน้ำเงินที่ระดับ 1, 2 และ 3 ส่วนที่ระดับ 0 ถือว่าไม่เกิดสีน้ำเงิน ตัวอย่างการคิดเปอร์เซ็นต์ของชิ้นพืชที่ทำการย้ายยีน เช่น ถ้ามีชิ้นตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง แล้วได้ผลที่ระดับการมองเห็นต่างๆ ดังนี้ ระดับ 0 มี 4 ชิ้น, ระดับ 1 มี 5 ชิ้น,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับ 2 มี 1 ชิ้น และระดับ 3 มี 0 ชิ้น แสดงว่าเกิดสีน้ำเงิน 6 ชิ้นใน 10 ชิ้น ดังนั้นผลของเปอร์เซ็นต์ที่ได้จึงเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

2.9 แคลลัสหลังจากตรวจผลแล้วทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ศึกษาการทดสอบต่อความต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี

3.1 เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารสูตร NB ที่มี ไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 เพาะเลี้ยงในที่มืดด้วยอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.3 ผลการทดสอบดูได้จากการเจริญได้ของเมล็ดข้าวเหนียวดำในอาหารสูตร NB ที่มี ไฮโกร-ไมซิน บี ความเข้มข้นต่างๆ

4. ศึกษาการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้น

4.1 เตรียมแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวเหนียวสันป่าตองที่มีอายุประมาณ 10 สัปดาห์

4.2 นำมาเพาะเลี้ยงอาหาร regenaration 3 สูตร

- สูตร reg. 1 = N_6+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
  Zeatin 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตร reg. 2 = N_6+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
  Zeatin 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- สูตร reg. 3 = N_6+NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
  Zeatin 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-30^{0}C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

4.4 ศึกษาการเจริญเป็นต้นโดยสังเกตการเกิดเป็นตุ่มเขียวที่ปรากฏบนแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการทดลอง

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส

จากการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เกิดเป็นแคลลัสในอาหาร NB 3 สูตร ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1.0 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ซูโครส 30.0 กรัมต่อลิตรและเคซีนไฮโดรไลเสท 0.2 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) ผลของการชักนำเอมบริโอแก่ให้เกิดเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ในข้าวเหนียวดำเป็นดังนี้

1.1 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 14 วัน

1.1.1 จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำ ในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร NB_1 เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และดูการเจริญของแคลลัสโดยการวัดพื้นที่ของแคลลัส พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส คือ 0.0954 0.0947 และ 0.1197 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 1)

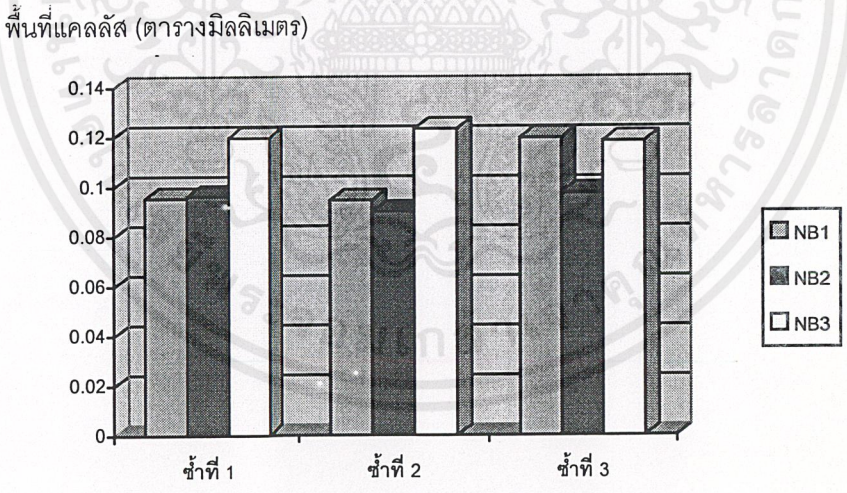
1.1.2 จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำ ในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร NB_2 เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และดูการเจริญของแคลลัสโดยการวัดพื้นที่ของแคลลัส พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส คือ 0.0964 0.0900 และ 0.0997 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 1)

1.1.3 จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำ ในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร NB_3 เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และดูการเจริญของแคลลัสโดยการวัดพื้นที่ของแคลลัส พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส คือ 0.1198 0.1234 และ 0.1122 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 14 วัน

ซ้ำที่	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)		
	NB_1	NB_2	NB_3
1	0.0954	0.0964	0.1198
2	0.0947	0.09	0.1234
3	0.1197	0.0997	0.1122
เฉลี่ย	0.1032	0.0953	0.1184



ภาพที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 21 วัน

1.2.1 จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำ ในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร NB_1 เป็นเวลา 21 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และดูการเจริญของแคลลัสโดยการวัดพื้นที่ของแคลลัส พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส คือ 0.1058 0.1172 และ 0.1127 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 2)

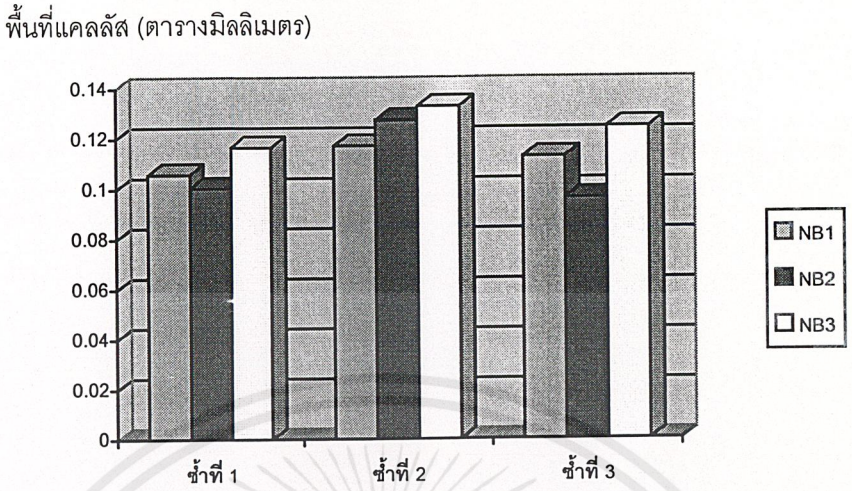
1.2.2 จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำ ในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร NB_2 เป็นเวลา 21 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และดูการเจริญของแคลลัสโดยการวัดพื้นที่ของแคลลัส พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส คือ 0.1003 0.1274 และ 0.0962 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 2)

1.2.3 จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำ ในอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร NB_3 เป็นเวลา 21 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ และดูการเจริญของแคลลัสโดยการวัดพื้นที่ของแคลลัส พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส คือ 0.1166 0.1327 และ 0.1245 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 2)

ตารางที่ 6 แสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 21 วัน

ซ้ำที่	พื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)		
	NB_1	NB_2	NB_3
1	0.1058	0.1003	0.1166
2	0.1172	0.1274	0.1327
3	0.1127	0.0962	0.1245
เฉลี่ย	0.1119	0.1079	0.1246

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

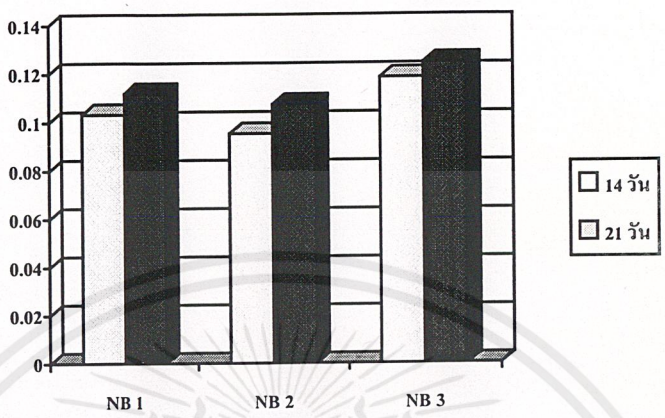


ภาพที่ 2 แผนภูมิแท่งแสดงผลการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 21 วัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวดำที่เพาะเลี้ยงโดยสูตรอาหาร NB_1 NB_2 และ NB_3 เป็นระยะเวลา 14 และ 21 วัน (ภาพที่ 3) โดยใช้ค่าเฉลี่ยจากทั้ง 3 ซ้ำทำให้ทราบว่า อาหารสูตร NB_3 เป็นสูตรที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส (ภาพที่ 4) จึงใช้อาหารสูตร NB_3 นี้ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

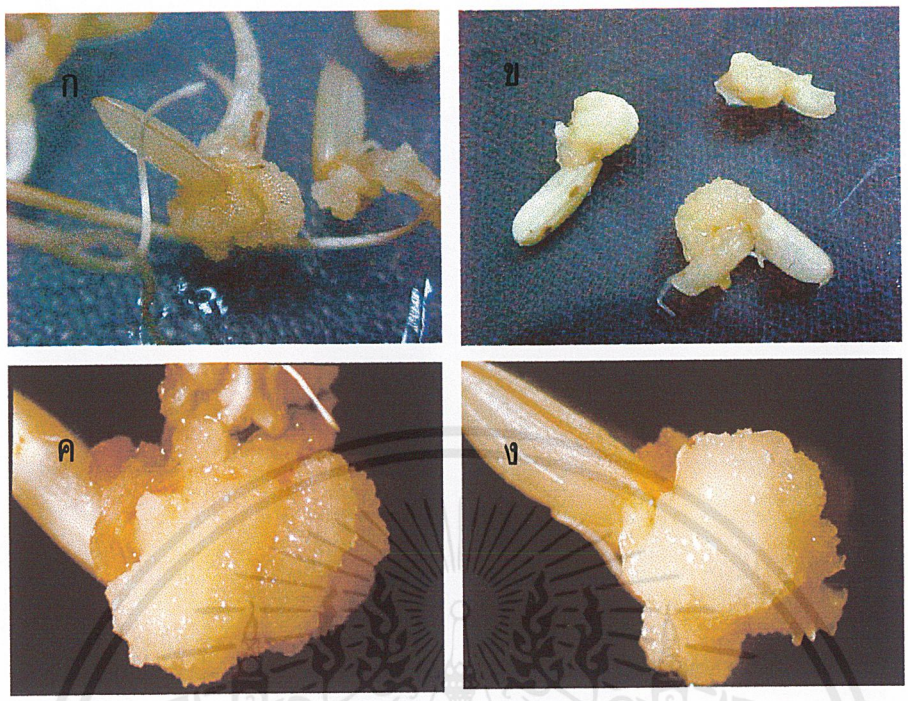
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นที่แคลลัส (ตารางมิลลิเมตร)



ภาพที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงการเปรียบเทียบผลการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวดำในอาหารสูตร NB_1 NB_2 และ NB_3 ระยะเวลา 14 และ 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 แคลลัสของข้าวเหนียวดำที่เจริญบนอาหารสูตร NB_3 ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน
ก และ ข : แคลลัสที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง
ค และ ง : ภาพขยายของแคลลัสเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาประสิทธิภาพของการย้ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

ผลของความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสข้าวเหนียว โดยสังเกตจากการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

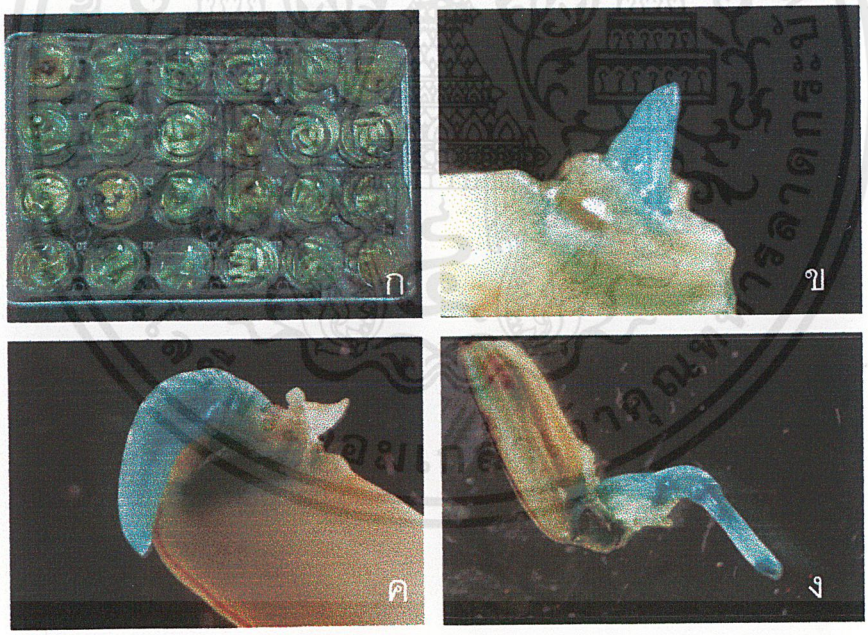
การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอมีทั้งหมด 4 ระดับ ดังนี้ (ภาพที่ 5)

0 = ไม่สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

1 = ไม่สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยตาเปล่า

2 = สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยตาเปล่า

3 = สามารถมองเห็นการเกิดสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสได้ด้วยตาเปล่าชัดเจน



ภาพที่ 5 ก : การทดสอบยีนกัส

ข : การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอในระดับ 1

ค : การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอในระดับ 2

ง : การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอในระดับ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

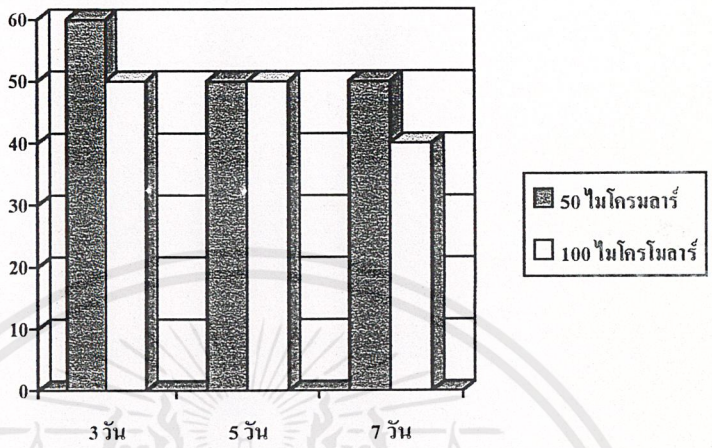
2.1 *Agrobacterium tumefaciens* **สายพันธุ์** AGL-1

ผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ พบว่าแคลลัสอายุ 3 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างแคลลัส 10 ชิ้น ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 6

ตารางที่ 7 แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ

อายุแคลลัส	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (ชิ้น)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (ไมโครโมลาร์)	ผลการย้ายยีนโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ชิ้น)				เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน
			0	1	2	3	
3 วัน	10	50	4	5	1	-	60
		100	5	4	1	-	50
5 วัน	10	50	5	5	-	-	50
		100	5	5	-	-	50
7 วัน	10	50	6	3	1	-	40
		100	6	4	-	-	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ

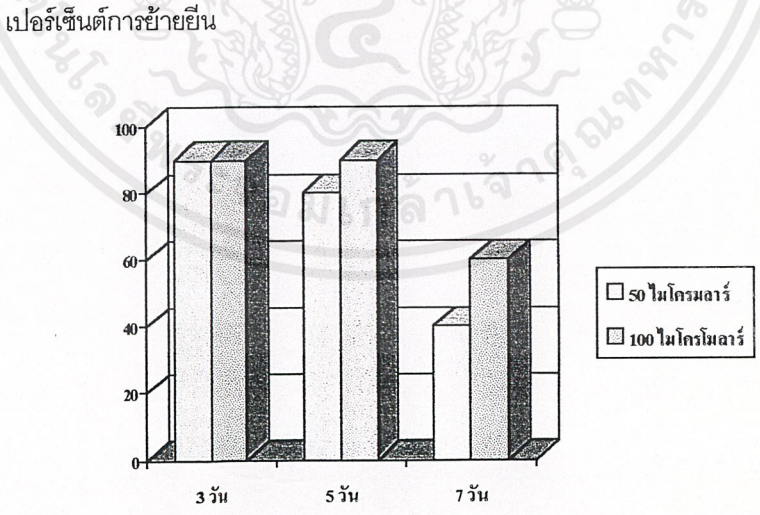
2.2 *Agrobacterium tumefaciens* **สายพันธุ์** EHA105

ผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ พบว่าแคลลัสอายุ 3 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และแคลลัสอายุ 5 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์ย้ายยีนดีที่สุด คือ 90 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างแคลลัส 10 ชิ้น ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ

อายุแคลลัส	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (ชิ้น)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (ไมโครโมลาร์)	ผลการย้ายยีนโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ชิ้น)				เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน
			0	1	2	3	
3 วัน	10	50	2	2	3	3	90
		100	1	2	3	4	90
5 วัน	10	50	2	-	2	6	80
		100	1	2	2	5	90
7 วัน	10	50	6	4	-	-	40
		100	4	5	1	-	60



ภาพที่ 7 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 *Agrobacterium tumefaciens* **สายพันธุ์** LBA4404

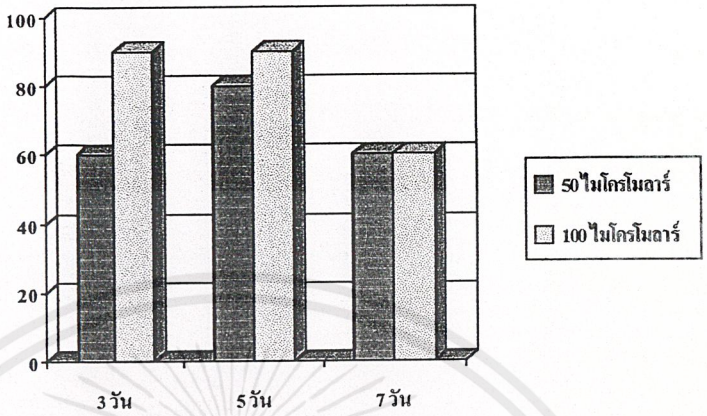
ผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ พบว่าแคลลัสอายุ 3 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และแคลลัสอายุ 5 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนดีที่สุด คือ 90 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างแคลลัส 10 ชิ้น ดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 8

ตารางที่ 9 แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ

อายุแคลลัส	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (ชิ้น)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (ไมโครโมลาร์)	ผลการย้ายยีนโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ชิ้น)				เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน
			0	1	2	3	
3 วัน	10	50	4	2	2	2	60
		100	1	1	3	5	90
5 วัน	10	50	2	-	2	6	80
		100	1	1	4	4	90
7 วัน	10	50	4	4	2	-	60
		100	4	4	2	-	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน



ภาพที่ 8 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 3 5 และ 7 วัน ในข้าวเหนียวดำ

จากการทดลองหาปัจจัยที่เหมาะของเชื้ออโกรแบคทีเรียมทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ที่มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนของข้าวเหนียวดำ โดยศึกษาใน 3 ปัจจัย คือ สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม อายุของแคลลัสและความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน พบว่าแต่ละปัจจัยให้ผลที่แตกต่างดังนี้

ข้าวเหนียวดำ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแก่ในอาหารสูตร NB_3 ให้ได้อายุแคลลัส 3 5 และ 7 วัน โดยใช้อโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าอายุแคลลัส 5 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพการย้ายยีนได้ดีที่สุด โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยเท่ากับ 75.0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

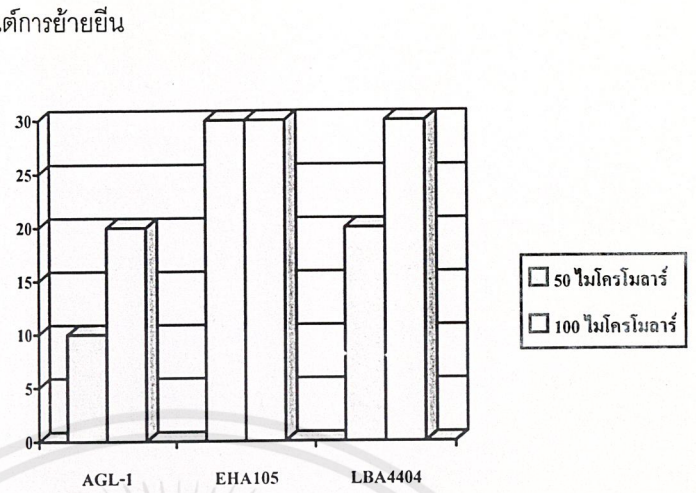
2.4 การย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง

ผลของการย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB_3 เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ คือ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เมื่อตรวจสอบยีนกัสและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ภาพที่ 10) พบว่า ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพการย้ายยีนได้ดีที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยเท่ากับ 26.25 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 9

ตารางที่ 10 แสดงผลของการย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* ในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง อายุ 10 สัปดาห์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (ชิ้น)	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (ไมโครโมลาร์)	ผลการย้ายยีนโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ชิ้น)				เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน
			0	1	2	3	
AGL-1	10	50	9	1	-	-	10
		100	8	2	-	-	20
EHA105	10	50	7	2	1	-	30
		100	7	1	2	-	30
LBA4404	10	50	8	2	-	-	20
		100	8	2	-	-	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนโดย *Agrobacterium tumefaciens* ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยมีความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง

3. ผลการทดสอบความต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี

เมื่อทำการเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำในอาหารสูตร NB_3 ที่มีไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าข้าวเหนียวดำสามารถเจริญได้ในในอาหารสูตร NB_3 ที่มีไฮโกรไมซิน บี ที่ความเข้มข้นสูงสุด 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบความต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี ของข้าวเหนียวดำ

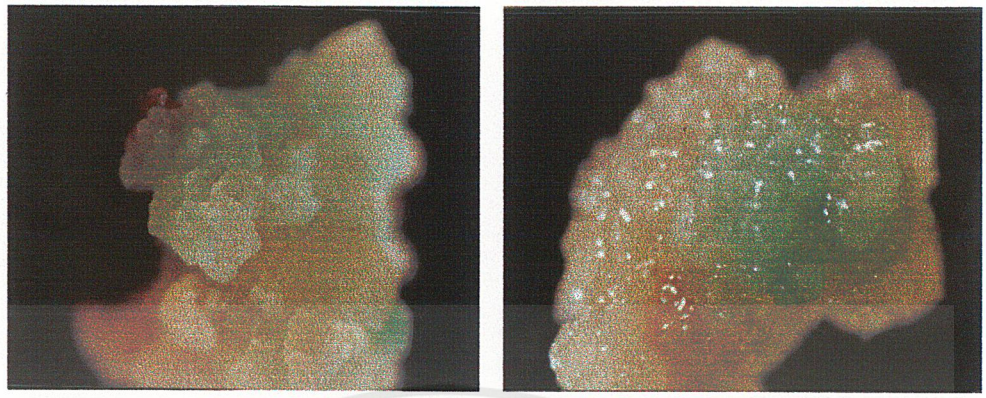
ระดับความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเอ็มบริโอแก่เริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนเอ็มบริโอแก่ที่สามารถเจริญได้ (ชิ้น)
10	6	6
20	6	6
30	6	5
40	6	3
50	6	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

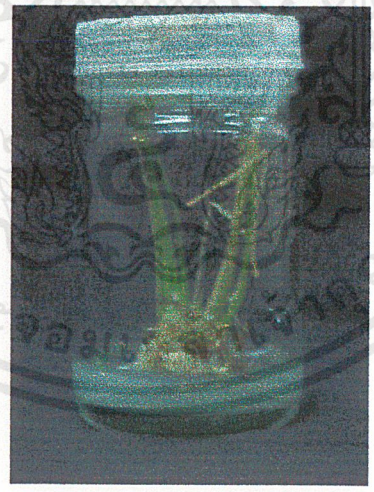
4. ผลการชักนำแคลลัสของข้าวเหนียวให้เจริญเป็นต้น

ผลจากการชักนำแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองอายุ 10 สัปดาห์ ให้เจริญเป็นต้น โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 รีเจเนอเรชัน 3 สูตร ที่มีซีเอทินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกสูตรอาหารให้ผลการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ดีพอกัน (รูปที่ 11) โดยดูได้จากการเกิดลักษณะตุ่มเขียวบนแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 การตรวจสอบการย้ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB_3 เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยดูจากการปรากฏสีน้ำเงินบนแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตริโอ



รูปที่ 11 ต้นข้าวเหนียวสันป่าตองจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร N_6 รีเจเนอเรชัน ที่มีซีเอทินความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1.ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำให้เจริญเป็นแคลลัส

ในการทดลองการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำในอาหารแข็งสูตร NB 3 สูตร คือ NB_1 NB_2 และ NB_3 ซึ่งประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30.0 กรัมต่อลิตร ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการวัดพื้นที่แคลลัสที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 14 และ 21 วัน ให้ผลการทดลองที่เหมือนกันคือ อาหารสูตร NB_3 ที่มีความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการชักนำเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำเจริญเป็นแคลลัสมากที่สุด ดูได้จากค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแคลลัสที่เลี้ยงในสูตรอาหารนี้มีค่ามากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม ทั้ง 3 สูตรนั้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและมีขนาดใกล้เคียงกัน

2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการย้ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium tumefeciens*

การทดลองหาประสิทธิภาพของปัจจัยที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium tumefeciens* ของข้าวเหนียว โดยศึกษา 3 ปัจจัยด้วยกัน คือ เชื้ออโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ คือ AGL-1 EHA105 และ LBA4404 อายุของแคลลัสและความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากการตรวจสอบยีนกัสโดยการดูสีน้ำเงินที่ปรากฏบนแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่าแต่ละปัจจัยให้ผลที่แตกต่างดังนี้

ข้าวเหนียวดำ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแก่ในอาหาร NB ให้ได้อายุแคลลัส 3 5 และ 7 วัน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าอายุแคลลัส 5 วัน ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพการย้ายยีนได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดสีน้ำเงินเฉลี่ย 75.0 เปอร์เซ็นต์

แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB_3 เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ พบว่า ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพการย้ายยีนได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดสีน้ำเงินเฉลี่ย 26.25 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทดสอบต่อความต้านทานต่อไฮโกรไมซิน บี

เมื่อทำการเลี้ยงเอมบริโอแก่ของข้าวเหนียวดำในอาหารสูตร NB_3 ที่มีไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าข้าวเหนียวดำสามารถเจริญได้ในอาหารสูตร NB_3 ที่มีไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้นสูงสุด 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดลองนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวดำที่ผ่านการย้ายยีนโดยอโกรแบคทีเรียม เนื่องจากแคลลัสจะมียีนต้านทานไฮโกรไมซิน บี (จากอโกรแบคทีเรียม) เมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มีไฮโกรไมซิน บี มากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถจะเจริญได้

4. ผลการชักนำแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองให้เจริญเป็นต้น

ผลจากการชักนำแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองให้เจริญเป็นต้น โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 รีเจเนอเรชัน 3 สูตร ที่มีซีเอทินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.25 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกสูตรอาหารให้ผลการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ดีพอกัน โดยดูได้จากการเกิดลักษณะตุ่มเขียวบนแคลลัส

จากผลการทดลองนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการทดลองใช้อาหารสูตร N_6 รีเจเนอเรชันทั้ง 3 สูตรนี้ ในการชักนำแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่ผ่านการย้ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียมให้เจริญเป็นต้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สงกรานต์ จิตตรากร., 2544. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย, ฝ่ายนิเทศน์สัมพันธ์สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพฯ : 13.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม., 2543. หลักเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อภิชาต วรรณจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ ธีรยุทธ ตู้จินดา., 2544. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย, ฝ่ายนิเทศน์สัมพันธ์สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพฯ : 80-121.

Balconi, C., Perugini, I., Castelletti, S., Reali, A., Russo, S., Chan, M.T., Lupotto, E., 1998. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) Italian caltivars. 1. Interaction among *Agrobacterium* strain end rice genotype in embryogenic callus of somatic and gametic origin. J. Genet. Breed. 52 : 313-323

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

Chiton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bendich, M.P. Gordon and Nester, E.W., 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detect in crown gall tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71 : 3672-3676.

Christou, P., L.F. Tmeria and Kofron, M., 1993.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 : 957-962.

Fraley, R.T., S.G. Rogers and Horch, R.B., 1986. Genetics transformation in higher plants. CRC Crit Rev. Plant Sci. 4 : 1-46.

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

Horsch, R.B., J.E. Fry, N. Hoffmann, M. Wallroth, D. Eichholtz, S.G. Rogers and Fraley, R.T., 1985. Transferring genes into plant. Science, 227, 1229-1231.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Salas, M.G., Park, S.H., Srivatanakul, M., Smith, R.H., 2001. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. Plant Cell Rep. 20 : 701-705.

Sanford, J.C., 1998 The biolistic process. Trends biotech. 6 : 299-302.

Svab, Z., P. Hajdukiewicz and Maliga, P., 1990. Stable transformation of plastids inhigher plant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 8526-8530.

Takashi, H., 1998. Optimizing the particle bombardment method for Efficient Genetic Transformation.Plant Biot. 32(4) : 239-247.

Toriyama, K., Y. Arimoto, H.U., chimiya and Hinatn, K., 1998. Transgenic rice rice plant after direct gene transfer into protoplasts. Bio/Technology.6 :1072-1074.

Urashibara, S., Tazawa, Y., Kawakishi and Kobayashi, M., Wakasa, K., 2001. Efficient Transformation of Suspension-culture Rice Cell Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Breed Science. 51 : 33-38.

Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, J.W., Christou, P., 1998. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. Theor. Appl. Genet. 96 : 164-169.

Vasil, V., S.M. Brown, D. Re, M.E. Fromm and Vasil, I.K.,1991. Stably Transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension culture of wheat. Bio/Tech. 9. 743-747.

Yara, A., Otani, M., Kusumi, K., Mutsuda, O., Shimada, T., 2001. Production of Transgenic Japonica Rice (*Oryza sativa*) Caltivar, Taichung 65, by the *Agrobacterium*-Mediated Method. Plant Biot.. 18(4) : 305-310.

Yin, Z., Wang, G.L., 2000. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. Theor. Appl. Genet. 100 : 461-470.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

วิธีทดสอบกัส (GUS Assay)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนกัสในยีนข้าว ทำโดยนำชิ้นเนื้อเยื่อของข้าวมาแช่ในสารละลาย GUS-buffer และบ่มเป็นเวลา 1 คืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการบ่มแล้วไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกไปจึงบันทึกผลโดยบันทึกจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนเป็นสีฟ้า

สารละลาย GUS-buffer ประกอบด้วย

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

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงสูตรอาหารแข็ง NB

stock solution	สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
สารละลาย D	KNO_3	2830
	$(NH_4)_2SO_4$	463
สารละลาย E	$CaCl_2.7H_2O$	166
สารละลาย F	$MgSo_4.7H_2O$	185
	KH_2PO	460
B5 micronutrients	KI	0.75
	H_3BO_3	3.0
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
	$MnSO_4.7H_2O$	10
	ZnSO4.7H2O	2.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

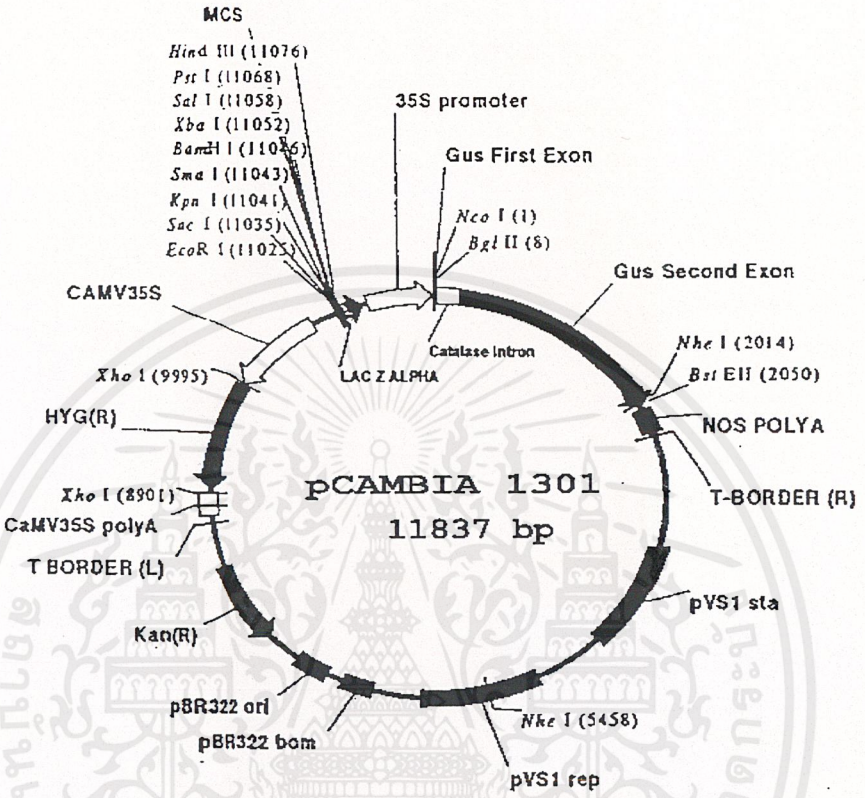
stock solution	สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	Na2Mo4.7H2O	0.25
	CuSO4.7H2O	0.025
FeEDTA	FeSO4.7H2O	27.8
	Na2EDTA.2H2O	37.8
B5 Vitamins	Inositol	100
	Nicotinic acid	1.0
	Pyridoxine HCl	1.0
	Thiamine HCl	10

เสริมด้วย	Casein hydrolysate	0.1	กรัมต่อลิตร
	L-proline	1.0	กรัมต่อลิตร
	Sucrose	30	กรัมต่อลิตร
	Phytagel	2.6	กรัมต่อลิตร
	pH	5.8	

ตารางภาคผนวกที่ 2 อาหารเหลว LB (LURIA-BERTANI) DEHYDRATE

Becto Tryptone	10	กรัม
Becto Yeast Extract	5	กรัม
Sodium Chloride	10	กรัม
ปรับ pH 7.0		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 ลักษณะโครงสร้างพลาสมิดของแบคทีเรีย *Agrobacterium* (Ti plasmid)

ที่มา : อนุรักษ์, 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้