สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย้ายยีนในหญ้าโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

นางสาว ฐิติมา วงษ์การค้า
นางสาว สุภาลัย ไชยสุต

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43963
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

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

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gene Transformation in Grasses by *Agrobacterium tumefaciens*

Miss. Thitima Wongkankha
Miss. Subhalai Jayasuta

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic year 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การย้ายยีนในหญ้าโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

Gene Transformation in Grasses by *Agrobacterium* sp.

โดย นางสาวฐิติมา วงษ์การค้า รหัสประจำตัวนักศึกษา 41053019

นางสาวสุภาลัย ไชยสุต รหัสประจำตัวนักศึกษา 41053083

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาค

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม)

..... กรรมการ

(ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

..... กรรมการ

(อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การย้ายยีนในหญ้าโดยใช้อโกรแบคทีเรียม
โดย นางสาวฐิติมา วงษ์การค้า
นางสาวสุภาลัย ไชยสุต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหญ้าพันธุ์เอฟ-60 พบว่าสูตรอาหารที่ทำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดคือ อาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิค 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร

การศึกษาความต้านทานของแคลลัสต่อไฮโกรไมซิน บี พบว่าแคลลัสอายุ 45 วันเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิค 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และไฮโกรไมซิน บี 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตได้

การศึกษาปัจจัยการย้ายยีนพบว่า เปอร์เซ็นต์การย้ายยีนดีที่สุดเมื่อ ใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ชิ้นส่วนที่เป็นข้อปล้อง และเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิค 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Gene transformation in Grasses by *Agrobacterium tumefaciens.*
Name	Miss Thitima Wongkankha
	Miss Subhalai Jayasuta
Department	Applied Biology
Special Project Advisor	Asst. Prof. Anurug Poeaim
Academic year	2001

Abstract

Grass's embryos culture of F-60 were culture on solid LS medium supplemented with 3 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 100 mg/l casein hydrolysate, 1 g/l L-proline and 2.6 g/l phytagel which induce numerous calli.

Callus for 45 days were culture on solid LS medium supplemented with 3mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 100 mg/l casein hydrolysate, 1 g/l L-proline, 2.6 g/l phytagel and 200 mg/l hygromycin B that callus haven't developed.

Using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, nodal segments, culture on solid LS medium supplemented with 3mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 100 mg/l casein hydrolysate, 1 g/l L-proline, 2.6 g/l phytagel and 50 mg/l acetosyringone were the best condition transform.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.นวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการ อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ ผศ. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย และตรวจแก้โครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดระยะเวลาการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ ทุกท่านที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 การดำเนินการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	19
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและวิจารณ์	30
ภาคผนวก 1	32
ภาคผนวก 2	35
เอกสารอ้างอิง	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้ออโกรแบคทีเรียมและโครงสร้างของพลาสมิด	17
2	กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน	22
3	กราฟแสดงการเปรียบเทียบพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าระหว่างอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่มีสารประกอบเหมือนกัน	23
4	แสดงลักษณะแคลลัสในอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร	24
5	แสดงลักษณะของแคลลัสก่อนและหลังเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร	25
6	แสดงการหยดและการเจริญเติบโตปกคลุมชิ้นส่วนหญ้าของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	26
7	แสดงจุสีน้ำเงินที่ปรากฏในแคลลัสและชิ้นส่วนพืช	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะแตกต่างระหว่างพืชตระกูลหญ้ากับพืชอื่นๆ	2
2	ตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช	10
3	ตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช	10
4	แสดงปริมาณสารที่เติมในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่ใช้ในการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส	15
5	แสดงความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันสามระดับ เพื่อใช้ทดสอบหาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี	16
6	แสดงสายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกนและชิ้นส่วนของหญ้าที่ใช้ในการทดลองหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีน	18
7	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน	20
8	แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน	21
9	แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในแคลลัสของหญ้า	27
10	แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในใบของหญ้า	27
11	แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในข้อปล้องของหญ้า	28
12	แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในรากของหญ้า	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

หญ้าญี่ปุ่น (Japanese lawngrass หรือ Korean lawngrass) เป็นหญ้าที่นิยมใช้กันมากในสมัยก่อน เนื่องจากทนทานต่อสภาพอุณหภูมิต่ำ ความแห้งแล้ง ความเค็ม และการใช้งาน แต่มีความสามารถในการฟื้นตัวได้ช้า ในปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากลำต้นและใบมีลักษณะแข็งกระด้าง ทำให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังของผู้ใช้ประโยชน์จากสนามหญ้า ประกอบกับหญ้าญี่ปุ่นมีอัตราการเจริญเติบโตและฟื้นตัวช้า แต่มีความหนาแน่นมาก ทำให้สนามหญ้านั้นดูไม่เรียบ ไม่สม่ำเสมอ (วิรัตน์, 2533) ดังนั้นจึงมีการคิดค้นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณภาพดี ทนต่อสภาพแวดล้อม และต้านทานเชื้อโรคต่างๆ สำหรับหญ้าญี่ปุ่นเพิ่งมีการทดลองในปี ค.ศ. 1998 โดย C. Inokuma ด้วยวิธีการใช้โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) เป็นตัวกลางในการย้ายยีนเข้าไปในโปรโตพลาส แต่สำหรับประเทศไทยวิธีการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมจะเป็นวิธีที่ดีกว่าเนื่องจากใช้งบประมาณค่อนข้างต่ำกว่าการย้ายยีนโดยวิธีอื่น ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องหาปัจจัยพื้นฐานต่างๆ ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าให้มีประสิทธิภาพดีเสียก่อน ในโครงงานพิเศษนี้จะเป็นการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำเอ็มบริโอแก่ของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส
2. หาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี
3. หาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

การจำแนกพืชตระกูลหญ้า

พืชในตระกูลหญ้า (Gramineae) คล้ายคลึงกับพืชในตระกูล Cyperaceae และ Juncaceae แต่สามารถแยกความแตกต่างได้ง่ายโดยอาศัยลักษณะทางต้น ใบ และดอก ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะแตกต่างระหว่างพืชตระกูลหญ้ากับพืชอื่นๆ (วิรัตน์, 2533)

ลักษณะที่แตกต่าง	Gramineae	Cyperaceae	Juncaceae
1. ลำต้น	กลมหรือแบน มีข้อและปล้องเด่นชัด ภายในปล้องส่วนมากกลวง	สามเหลี่ยมไม่มีข้อและปล้องภายในลำต้นประกอบด้วยไส้กลางแบบฟองน้ำสีขาว	กลมไม่มีข้อและปล้อง ภายในประกอบด้วยไส้กลางแบบฟองน้ำสีขาว
2. การจัดเรียงตัวของใบ	2 แถว	3 แถว	3 แถว
3. กาบใบ	แยกจากลำต้นได้ แบ่งเป็นแผ่นใบและกาบใบได้เด่นชัด	แยกไม่ได้จากลำต้น	อาจแยกได้หรือไม่ได้จากลำต้น

พืชตระกูลหญ้าแบ่งได้เป็น 6 วงศ์ย่อย (subfamily) ดังนี้ Festucoideae, Panicoideae, Arundinoideae, Bambusoideae, Oryzoideae และ Eragrostoideae ทั้ง 6 วงศ์ย่อยนี้จะมีทั้งหมด 28 กลุ่ม (Tribes) ดังนี้ (วิรัตน์, 2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agrosteae	Bambuseae	Maydeae	Phalarideae
Andropogoneae	Chlorideae	Nardeae	Phareae
Anomochloeae	Eragrosteae	Olyreae	Sporoboleae
Aristideae	Festuceae	Oryzeae	Stipeae
Arundineae	Hordeae	Paniceae	Streptochaeteae
Arundinelleae	Leptureae	Pappophoreae	Thysanolaeneae
Aveneae	Lygeae	Parianeae	Zoysieae

การจำแนกหญ้าสนามตามหลักทางพฤกษศาสตร์

หญ้าสนามเป็นพืชที่อยู่ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยได้จัดให้หญ้าสนามและหญ้าทุกชนิดอยู่ในวงศ์เดียวกันคือ วงศ์หญ้า (Family Gramineae) ซึ่งหญ้าสนามอยู่ใน 2 วงศ์ย่อยคือ วงศ์ย่อย Festucoideae และ Panicoideae ในวงศ์ย่อยทั้งสองประกอบด้วยกลุ่มของหญ้าชนิดต่างๆ รวมกันจำนวน 25 กลุ่ม โดยมีหญ้าสนามที่สำคัญอยู่เป็นสมาชิกของกลุ่มต่างๆ จำนวน 6 กลุ่ม ดังนี้

วงศ์ย่อย Festucoideae ประกอบด้วยกลุ่มและหญ้าสนามที่เป็นสมาชิกของกลุ่มดังต่อไปนี้

1. กลุ่ม Chlorideae หญ้าสนามที่เป็นสมาชิก คือ หญ้าบัฟฟาโล หญ้าเบอร์มิวดา และหญ้ากรามา
2. กลุ่ม Hordeae หญ้าสนามที่เป็นสมาชิก คือ หญ้าวีท และหญ้าไรย์
3. กลุ่ม Zoysieae มีหญ้าสนามที่เป็นสมาชิก คือ หญ้าญี่ปุ่น หญ้านวลน้อย และหญ้าในสกุลเดียวกัน (Genus Zoysia)
4. กลุ่ม Agrostideae มีหญ้าสนามที่เป็นสมาชิก คือ หญ้าเบ็นท์ หญ้าเร็ดท็อป หญ้าบีช หญ้า ธีโมตี
5. กลุ่ม Festuceae มีหญ้าสนามที่เป็นสมาชิก คือ หญ้าเฟสตู หญ้าบูล

วงศ์ย่อย Panicoideae ประกอบด้วยกลุ่มหญ้าเพียงกลุ่มเดียวที่มีหญ้าสนามเป็นสมาชิกอยู่ คือ กลุ่ม Paniceae ซึ่งมีหญ้าสนามที่เป็นสมาชิกอยู่ คือ หญ้าพรม หญ้ามาเลเซีย หญ้ามาเฮีย หญ้าดิดูยู และหญ้าออกัสติน (วิรัตน์,2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์ ตลอดจนชนิดและสภาพชิ้นส่วนพืช (explants) ที่จะนำมาเลี้ยง ที่นิยมใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มากที่สุดคืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส เนื่องจาก การเลี้ยงแคลลัสของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประ สิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทั่วๆ ไปแล้วสามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้ (รังสฤษฎ์, 2541; อนุรักษ์, 2544)

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic substances)
   1.1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macronutrients) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปตัสเซี่ยม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณมากและขาด ไม่ได้โดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณ 25-60 มิลลิโมลลาร์ หรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
   1.2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micronutrients) ได้แก่ เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โคบอล (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) และโบรอน (B) โดย ทั่วไปพืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (Organic substances)
   2.1 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon sources) ใช้เป็นแหล่งในการในพลังงาน มักเป็นสาร ประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ ปกติจะใช้น้ำตาล 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ การเตรียมอาหาร 1 ลิตร น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่ ได้แก่ กลูโคส (glucose) ฟรุกโทส (fructose) แมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) มอลโทส (maltose)
   2.2 วิตามิน (vitamins) ที่ใช้กันมากได้แก่ ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) อินโนสิ-ทอล (inositol) ไนอะซิน (niacin) ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl) ไบโอติน (biotin) กรดแพนโทเธอนิค (pantothenic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดฟอลิค (folic acid) แคลเซียมแพนโทเธอเนต (calcium pantothenate) ไซยาโน โคบาลามิน (cyanocobalamine) โคลีนคลอไรด์ (choline chloride) ไรโบฟลาวิน (riboflavin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กรดอะมิโนและเอไมด์ (amino acids and amides) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ความต้องการกรดอะมิโนของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงสามารถคำนวณได้โดยผันแปรกับปริมาณการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท (casien hydrolysate) กรดอะมิโนและเอไมด์ที่ใช้แพร่หลายและได้ผลดี คือ อาร์จีนิน (L-argenin) กรดแอสปาร์ติค (L-aspartic acid) แอสปาราจีน (L-asparagine) กรดกลูตามิค (L-glutamic acid) และกลูตามิน (L-glutamine)

4. ไนโตรเจนเบส (nitrogen bases) สารประกอบพวกไนโตรเจนเบส กรดไซทิไดลิค (cytidylic acid) และกรดกัวไนลิค (guanylic acid) มีส่วนกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยง

5. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์เองได้ และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

   5.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxin) มีส่วนช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส เช่น 3-อินโดลอะเซติคแอซิด (3-indolacetic acid) แอลฟาแนพธาลีนอะเซติคแอซิด (α-napthalene acetic acid) 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) และ 3-อินโดลบิวไทริคแอซิด (3-idolbutyric acid)

   5.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนิน (adenin) สามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขณะที่มีออกซินผสมอยู่ด้วย และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในพืชที่กำลังเป็นโรคปุ่มปม สารพวกนี้ที่ใช้กันมากได้แก่ 6-ฟัลเฟอริลอะมิโนพิวรีน (6-furferylaminopurine) 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-benzylaminopurine) 2-ไอโซเพนทีนิลอะมิโนพิวรีน (2-isopentenyl aminopurine) และซีเอทิน (zeatin)

   5.3 สารในกลุ่มจิบเบอร์เรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อย ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิค (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิค (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญเกิดขึ้น

6. สารประกอบอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut milk) น้ำมะเขือเทศ (tomato juice) น้ำมันฝรั่ง (potato juice) เป็นต้น (รังสฤษฎ์, 2541; อนุรักษ์,2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวทีนอยด์ (flavotenoids) หรือสีม่วงจากแอนโธไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus (รังสฤษฎ์, 2541)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชหรือเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้ (รังสฤษฎ์, 2541)

1. ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยง ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป ถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กเกินไปจะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การถูกกระทบกระเทือนขณะแยกเนื้อเยื่อจะสูงหากตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเล็กมากในพืชบางชนิด

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ โดยทั่วๆ ไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินสมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส ความเข้มข้นของออกซินที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆ จะอยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินที่ใช้จะอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักๆ ทั่วไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามิน กรดแอสปาติค สารพวกเคซีนไฮโดรไลเซท และน้ำมันมะพร้าว ก็มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และ/หรือ แซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อหายใจด้วย

6. สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่าและตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

ข้อควรพิจารณาในการเลี้ยงแคลลัส

ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อถูกนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและต้องการเทคนิคการกดเพียงเบาๆ ให้ชิ้นส่วนดังกล่าวจมลงไปในวุ้นเพียงเล็กน้อยเพื่อให้เนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารได้ดีขึ้น ถ้าเป็นส่วนปลายรากจะเกิดแคลลัสได้ดีขึ้นถ้าวางแนวราบลงบนอาหาร ขณะที่ชิ้นส่วนที่ตัดมาจากลำต้นควรวางในแนวตั้งให้ปลายที่ถูกตัดจมอยู่ในวุ้น ปิดฝาจานด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ขณะเดียวกันอากาศที่มีออกซิเจนก็สามารถผ่านเข้าไปได้ ปกติควรเพาะในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เหมาะสมชิ้นส่วนพืชจะสร้างแคลลัสมากพอที่จะแบ่งและเปลี่ยนอาหารใหม่ (subculture) ภายใน 3-8 สัปดาห์ ปกติการเปลี่ยนอาหารจะกระทำทุกๆ 4 สัปดาห์ และแคลลัสจากพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรควรแยกออกได้ 8-10 ชิ้น (รังสฤษฎ์, 2541)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2541)

1. การขยายพันธุ์ (micropropagation) สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคได้จำนวนมาก
2. การผลิตโปรโตพลาส (protoplasts) แคลลัสมีความเหมาะสมต่อการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา
3. การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (secondary metabolites)
4. การผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids) โดยใช้สารโคลชิซินชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน (tolerant and resistant plants) เช่นทนทานต่อสภาพดินเค็ม หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา

ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์อโกรแบคทีเรียม

อโกรแบคทีเรียมเป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ และมีแหล่งอาศัยในดิน รูปร่างเป็นท่อนยาว สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่เกิดบาดแผล แล้วทำให้เกิดปุ่มปม (tumor) โดยการทำให้เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเซลล์คอร์เท็กซ์ (cortex) พบทั้งบนรากและลำต้น ซึ่งการเกิดปุ่มปมนี้จะไปรบกวนระบบหมุนเวียนของน้ำและอาหารในพืช ทำให้พืชไม่เจริญเติบโตหรือตาย เมื่อนำเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ถึงแม้ว่าจะกำจัดอโกรแบคทีเรียมออกไปแล้ว เนื้อเยื่อปุ่มปมจะสร้างสารพวกโอปีน (opine) ซึ่งจะเป็นอาหารของอโกรแบคทีเรียมอีกต่อหนึ่ง โดยอโกรแบคทีเรียมสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (ประสิทธิ์,2542; สุรินทร์, 2543; อนุรักษ์, 2544)

1. ใช้กรดอะมิโนไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง 3-คีโตแลคโตส (3-ketolactose)
   1.1. ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *Agrobacterium tumefaciens*
   1.2. ไม่ทำให้เกิดปุ่มปม คือ *Agrobacterium radiobacter*
2. ไม่ใช้กรดอะมิโนไนเตรทและเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้าง 3-คีโตแลคโตส
   2.1. ทำให้เกิดรากฝอย คือ *Agrobacterium rhizogenes*
   2.2. ทำให้เกิดปุ่มปมบนราสเบอรี่ คือ *Agrobacterium rubi*

พลาสมิดในอโกรแบคทีเรียม

อโกรแบคทีเรียมจะมีพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140-235 กิโลเบส เรียกพลาสมิดนี้ว่า Tumor-inducing plasmid หรือ Ti plasmid เชื้ออโกรแบคทีเรียมที่พบพลาสมิดนี้คือ *Agrobacterium tumefaciens* และ *Agrobacterium rhizogenes* ซึ่งพลาสมิด Ti จะทำให้พืชเกิดลักษณะปุ่มปมหลังได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผล เกิดจากการเจริญอย่างรวดเร็วของเซลล์คอร์เท็กซ์ และเมื่ออโกรแบคทีเรียมบุกรุกเข้าไปในพืชจะมีดีเอ็นเอ (DNA) บางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายทอดและแทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียกดีเอ็นเอนี้ว่า T(transferred) DNA ยีนในส่วนทีดีเอ็นเอมีบทบาททำให้พืชสร้างโอปีน โดยมีเอนไซม์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวข้องคือ ออกโทปีนดีไฮโดรจีเนส (octopine dehydrogenase) และโนปาลีนดีไฮโดรจีเนส (nopaline dehydrogenase) ที่ถูกกำหนดโดยยีนบนส่วนทีดีเอ็นเอ เป็นส่วนที่มีผลกระตุ้นให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มปม (ประสิทธิ์,2542; สุรินทร์, 2543; อนุรักษ์,2544)

กลไกการย้ายยีนของ *Agrobacterium tumefaciens*

รูปแบบของการติดเชื้ออโกรแบคทีเรียมสังเกตเห็นได้โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการยึดเกาะ ของอโกรแบคทีเรียมกับยาสูบและแครอท คือ (ประสิทธิ์, 2542)

ระยะที่ 1 แบคทีเรียจะยึดเกาะที่ตำแหน่งเป้าหมาย (Receptor = R) ที่จำเพาะบนผิวของเซลล์พืช

ระยะที่ 2 หลังจากเกิดการยึดเกาะแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยเซลลูโลส

ระยะที่ 3 เส้นใยเซลลูโลสจะยึดเกาะแบคทีเรียที่ผิวของผนังเซลล์ (Cell wall,CW) ซึ่งพืชไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและแยกแบคทีเรียออกจากเซลล์พืชได้

ระยะที่ 4 เส้นใยที่มีความยาวจะยึดกับแบคทีเรียตัวอื่น

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

ระยะที่ 6 แบคทีเรียที่ถูกจับโดยเส้นใยจะมีการสร้างเส้นใยอีกด้วยตัวเองทำให้มีการยึดเกาะทางอ้อมกับเซลล์พืชและเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะผนังเซลล์พืชผ่านตำแหน่งเป้าหมายและเส้นใยเซลลูโลส

ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

พลาสมิด Ti ประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reportor gene) ที่มีข้อแตกต่างกันคือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะบางประการในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนโดยการถ่ายฝากทำให้สามารถแยกออกได้โดยง่ายเพื่อใช้ตรวจสอบผลของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และสามารถแสดงออกได้มากน้อยเพียงไรในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใด ในพืชยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลอาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบว่าทำงานได้ตลอดเวลาในเนื้อเยื่อทุกชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะต่ออยู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์ (ประสิทธิ์,2542)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช (สุรินทร์,2543)

ยีนเครื่องหมาย	เอนไซม์หรือโปรตีนที่สร้างได้	ลักษณะที่แสดงออก
hpt	Hygromycin phosphotransferase	ต้านทานไฮโกรไมซิน
dhfr	Dihydrofolate reductase	ต้านทานเมโธทรีเสท
CAT	Chloramphenical acetyltransferase	ต้านทานคลอแรมเฟนิคอล
NPT II	Neomycin phosphotransferase	ต้านทานกานามัยซิน
Aro A	5-enolpyruvul shilimate-3-phosphate synthase	ต้านทานไกลโฟเสท

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช (สุรินทร์, 2543)

ยีนรายงานผล	เอนไซม์หรือโปรตีนที่สร้างได้
CAT	Chloramphenical acetyltransferase
GUS	Beta-glucuronidase
nos	Nopaline synthase
luc	Luciferase
β-gal	Beta-galactosidase
gfp	Green fluorescent protein

Nayak S.และคณะ (1996) ทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสของหญ้าพันธุ์ lemongrass (*Cymbopogen flexuous* (Nees.) Wats) ในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog,1962) (ภาคผนวก 1) และ N_6 (ภาคผนวก 1) ที่มีส่วนประกอบของฮอร์โมนต่างกัน พบว่าเมื่อเติมฮอร์โมน 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด แอลฟา-แนฟทาลีนอะเซติคแอซิด หรือไคเนติน อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียว จะไม่สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสได้ แต่เมื่อผสม 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิดและไคเนตินลงในอาหารจะพบว่าเริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นและสังเกตเห็นการเจริญเติบโต หลังทำการทดลองครบ 30 วัน ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหาร MS จะสามารถเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหาร N_6 ที่มีปริมาณฮอร์โมนเท่ากันทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประการ โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสให้เจริญเติบโตได้ดีที่สุด คืออาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-แนฟทาลีนอะเซติคแอซิด 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Ashok และ Rongda (2000) ในการทดลองพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 3 กรัมต่อลิตร 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6-เบนซิลอะดีนิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่ชักนำให้ข้อปล้องของหญ้าเบอร์มิวดาเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และแคลลัสจะเริ่มปรากฏในสัปดาห์แรก โดยอัตราการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับปริมาณของออกซินที่ได้รับ หลัง 4 สัปดาห์ในการเพาะเลี้ยงขนาดของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 3 เท่า

Inokuma และคณะ (1998) ทำการปรับปรุงหญ้าสายพันธุ์ Japanese lawngrass โดยใช้โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol,PEG) เป็นตัวช่วยย้ายยีนเข้าไปในโปรโตพลาสของต้นพืชชนิดนี้ ในการทดลองจะใช้พลาสมิด pBc1 ที่ประกอบด้วยยีน *hph* (Hygromycin phosphotransferase) และยีน *GUS* (β - glucuronidase) การคัดเลือกพืชที่มีการย้ายยีนเข้าไปจะใช้ไฮโกรไมซิน(hygromycin)ที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 50 100 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าพืชเริ่มหยุดการเจริญเติบโตเมื่อไฮโกรไมซินมีความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉะนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ไฮโกรไมซินความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นตัวคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการย้ายยีนด้วยการทำโพลีเมอเรสเชนรีเอคชั่น (Polymerase Chain Reaction, PCR) และเซาเทิร์นไฮบริไดเซชั่น (Southern hybridization) พบว่ายีนกัสจะแสดงออกในรากและใบของ Japanese lawngrass

Lutfor Rahman S. M. และคณะ (2000) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Zoysia japonica* Steud. โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ อโกรแบคทีเรียมที่ต่างสายพันธุ์ ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน ที่ต่างกันพบว่า หลังจากพืชถูกย้ายยีนไปแล้ว 24 ชั่วโมง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pIG121) สามารถย้ายยีนกัส (*GUS* gene) เข้าไปในหญ้าได้ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเลี้ยงพืชที่ย้ายยีนแล้วเป็นเวลา 8 วัน พบว่า *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pIG2121Hm) จะเกิดการคงอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และอาหารที่เหมาะในการเพาะเลี้ยงหลังจากมีการย้ายยีนของ *Agrobacterium tumefaciens* ควรมีส่วนประกอบของอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

Yu T. T. และคณะ (2000) ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของหญ้าเบ็นท์ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส คืออาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 40 วัน จากนั้นนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 101 เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3-4 สัปดาห์ บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าแคลลัสแสดงสีน้ำเงินแกมเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดหญ้าพันธุ์เอฟ-60
2. เชื้ออโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*)
   - 2.1. สายพันธุ์ AGL-1
   - 2.2. สายพันธุ์ LBA 4404
   - 2.3. สายพันธุ์ EHA 105
3. สารเคมี
   - 3.1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็งสูตร MS และ LS
   - 3.2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LB
   - 3.3. สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)
   - 3.4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด
   - 3.5. กรดอะมิโน ได้แก่ แอล-โพรลีน และเคซีนไฮโดรไลเซท
   - 3.6. แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
   - 3.7. อะซิโตไซลิงโกน
   - 3.8. ไฮโกรไมซิน บี (hygromycin B)
   - 3.9. ซีโฟแซน (cefoxan)
   - 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7. กระบอกตวง

4.8. มีดผ่าตัด

4.9. ปากคีบ

4.10.อะลูมิเนียมฟลอย

4.11.ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.12.ตู้ปลอดเชื้อ

4.13.เครื่องเขย่า

4.14.ไมโครเวฟ

4.15.ตู้บ่มเชื้อ

4.16.ไมโครปิเปตต์ และทิปขนาดต่างๆ

4.17.หม้อนึ่งความดัน

4.18.เวอร์เนีย

4.19.เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและแบบหยาบ

4.20.เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

4.21.กล้องสเตอริโอพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

1. นำเมล็ดแก่ของหญ้าพันธุ์เอฟ-60 มาบดด้วยโกร่งให้เอ็มบริโอภายในหลุดออกมา

2. นำเอ็มบริโอของหญ้ามาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่เอ็มบริโอลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบาๆด้วยมือเป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นเปลี่ยนมาแช่เอ็มบริโอในสารละลายคลอรอกซ์ที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน-20 (Tween-20) 2-3 หยด และเขย่าเบาๆด้วยมือเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ด้วยวิธีการแช่และเขย่าเบาๆ ด้วยมือ

3. วางเอ็มบริโอของหญ้าลงบนกระดาษชำระที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้เอ็มบริโอของหญ้าแห้ง

4. คีบเอ็มบริโอของหญ้ามาวางบนอาหารแข็งสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) (ภาคผนวก 1)และ MS ที่มี 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด เคซีนไฮโดรไลเซท และแอล-โพรลีน ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) และอาหารทุกสูตรมีไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร

5. ปิดรอบจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ตรวจสอบการเจริญเป็นแคลลัส เมื่อครบ 60 วัน โดยใช้เวอร์เนีย วัดความกว้างและความยาวของแคลลัสที่เกิดขึ้นทั้งหมด ในแต่ละจานเพาะเลี้ยง นำค่าที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตรหาพื้นที่ของแคลลัส คือ ความกว้างคูณความยาว มีหน่วยเป็นตารางเซนติเมตร (cm^3)

7. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารที่เติมในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่ใช้ในการศึกษาการชักนำเอ็มบริโอแก่ของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เคซีนไฮโดรไลเซท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	แอล-โพรลีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	อาหารสูตร	
			LS	MS
3	0	0	LS 3.0.0	MS 3.0.0
3	100	500	LS 3.100.500	MS 3.100.500
3	100	1000	LS 3.100.1000	MS 3.100.1000
5	0	0	LS 5.0.0	MS 5.0.0
5	100	500	LS 5.100.500	MS 5.100.500
5	100	1000	LS 5.100.1000	MS 5.100.1000

การทดลองที่ 2 การหาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี

1. ในการหาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี จะใช้แคลลัสที่อายุ 45 วัน ในการทดสอบ โดยที่จะใช้ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันสามระดับคือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทดสอบว่าที่ความเข้มข้นใดที่ทำให้แคลลัสไม่สามารถเจริญได้

2. เตรียมอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการทดลองที่ 1 เนื่องจากเป็นสูตรที่ทำให้เกิดการเจริญเป็นแคลลัสมากที่สุด

3. เติมไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้นข้นแตกต่างกันสามระดับคือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำแคลลัสอายุ 45 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ในระดับที่แตกต่างกัน ระดับละ 9 แคลลัส

5. นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

6. ตรวจสอบผลความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี ว่าที่ความเข้มข้นใดที่ทำให้แคลลัสไม่สามารถเจริญได้ โดยดูจากขนาดของแคลลัสนั้นมีขนาดเล็กลงหรือไม่ และสีของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีดำหรือไม่ ถ้าแคลลัสมีขนาดเล็กลงและสีของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีดำแสดงว่าที่ความเข้มข้นของไฮโกรไมซินนั้นทำให้แคลลัสไม่สามารถเจริญได้

7. บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันสามระดับ เพื่อใช้ทดสอบหาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)
H1	50
H2	100
H3	200

การทดลองที่ 3 การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

การหาปัจจัยที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมเข้าสู่หญ้า ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องดังนี้ สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และชิ้นส่วนของหญ้าที่ใช้ในการย้ายยีน (ตารางที่ 6)

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

2. นำแคลลัสอายุ 45 วัน และชิ้นส่วนของหญ้าได้แก่ ข้อปล้อง ใบ และราก มาตัวอย่างละ 10 ชิ้น เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการทดลองที่ 1 เนื่องจากเป็นสูตรที่ทำให้เกิดการเจริญเป็นแคลลัสมากที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สุด และอะซิโตไซลิงโกนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 6) แล้วนำมาหยดเชื้ออโกรแบคทีเรียมทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้ออโกรแบคทีเรียมเจริญ

4. นำแคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้ามาล้างฆ่าเชื้ออโกรแบคทีเรียมด้วยซีโฟแซน ที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร 2 ครั้ง

5. นำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนกัส (ภาคผนวก 2) โดยย้อมใน X-glue ที่มีส่วนผสมของ GUS-buffer

6. ตรวจสอบผลการย้ายยีนโดยการสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่าง โดยมีระดับผลการย้ายยีนดังนี้

ระดับที่ 0 ไม่มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่าง

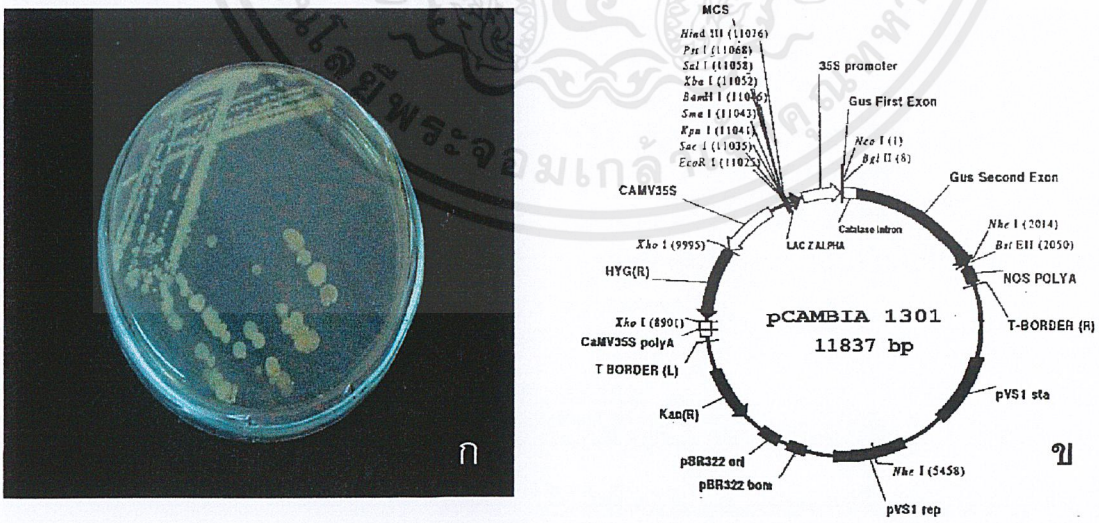
ระดับที่ 1 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างเล็กน้อย ต้องสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์

ระดับที่ 2 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างเล็กน้อย สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

ระดับที่ 3 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างชัดเจน สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

7. บันทึกผลการทดลองและคำนวณเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนของแต่ละชิ้นส่วน

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน} = \frac{\text{จำนวนชิ้นที่พบจุดสีน้ำเงิน} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นทั้งหมด}}$$



รูปที่ 1 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้ออโกรแบคทีเรียมและโครงสร้างของพลาสมิด

ก. ลักษณะการเจริญของเชื้ออโกรแบคทีเรียมบนอาหารแข็งสูตร LB

ข. โครงสร้างของพลาสมิด pCAMBIA 1301

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43963

ตารางที่ 6 แสดงสายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และชิ้นส่วนของหญ้าที่ใช้ในการทดลองหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีน

สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม	ชิ้นส่วนของหญ้าที่ใช้ทดลอง	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
AGL-1	แคลลัส	50
		100
	ใบ	50
		100
	ข้อปล้อง	50
		100
	ราก	50
		100
LBA 4404	แคลลัส	50
		100
	ใบ	50
		100
	ข้อปล้อง	50
		100
	ราก	50
		100
EHA 105	แคลลัส	50
		100
	ใบ	50
		100
	ข้อปล้อง	50
		100
	ราก	50
		100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหญ้าพันธุ์เอฟ-60 ในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด เคซีนไฮโดรไลเซท และแอล-โพรลีน ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) โดยอาหารทุกสูตรมีไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหญ้าพันธุ์เอฟ-60 เป็นเวลา 60 วัน พบว่าอาหารทั้ง 12 สูตร สามารถชักนำให้เอ็มบริโอของหญ้าพันธุ์เอฟ-60 เจริญเป็นแคลลัสได้ขนาดแตกต่างกัน จากการคำนวณหาพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสโดยใช้เวอร์เนียวัดความกว้างและความยาวของแต่ละแคลลัส จะพบความแตกต่างของพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน (ตารางที่ 7) เมื่อนำพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสในอาหารแข็ง LS สูตรต่างๆ มาทำกราฟเปรียบเทียบ จะพบว่าอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร จะมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด (รูปที่ 2 ก และรูปที่ 4 ก-ง) ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีการเติมเคซีนไฮโดรไลเซท และแอล-โพรลีน จะมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด (ตารางที่ 8 และรูปที่ 2 ข) เมื่อนำพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน มาทำกราฟเปรียบเทียบ จะพบว่าอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร จะมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด (รูปที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน

แคลลัส	LS 3.0.0	LS3.100.500	LS3.100.1000	LS5.0.0	LS5.100.500	LS5.100.1000
แคลลัสที่ 1	0.1452	0.1305	1.2922	0.1938	0.7704	0.1147
แคลลัสที่ 2	0.1364	0.1368	1.8216	0.7854	0.1435	0.3895
แคลลัสที่ 3	0.1408	0.2058	0.9555	0.1936	0.9555	0.0294
แคลลัสที่ 4	0.1276	0.288	1.3566	0.3234	0.3564	0.0168
แคลลัสที่ 5	0.1156	0.0442	1.1655	0.765	0.6426	0.0574
แคลลัสที่ 6	0.0696	0.171	0.6077	0.3068	0.1599	0.117
แคลลัสที่ 7	0.0816	0.1548	0.2904	0.6666	0.1666	0.1215
แคลลัสที่ 8	0.0594	0.1088	0.3652	0.4725	0.8712	0.0528
แคลลัสที่ 9	0.0272		1.3965	0.308	0.8295	0.02116
แคลลัสที่ 10			2.3668	0.3245	0.4851	1.0736
แคลลัสที่ 11			1.0795	0.2065	1.674	0.4565
แคลลัสที่ 12			0.5824		1.5251	0.0924
แคลลัสที่ 13						0.1156
แคลลัสที่ 14						0.1537
แคลลัสที่ 15						0.0783
รวม	1.569	1.2399	13.2799	4.5461	8.5798	2.8903
ค่าเฉลี่ย	0.1743	0.1549	1.1067	0.4133	0.715	0.1927

หมายเหตุ หน่วยเป็นตารางเซ็นติเมตร (cm^3)

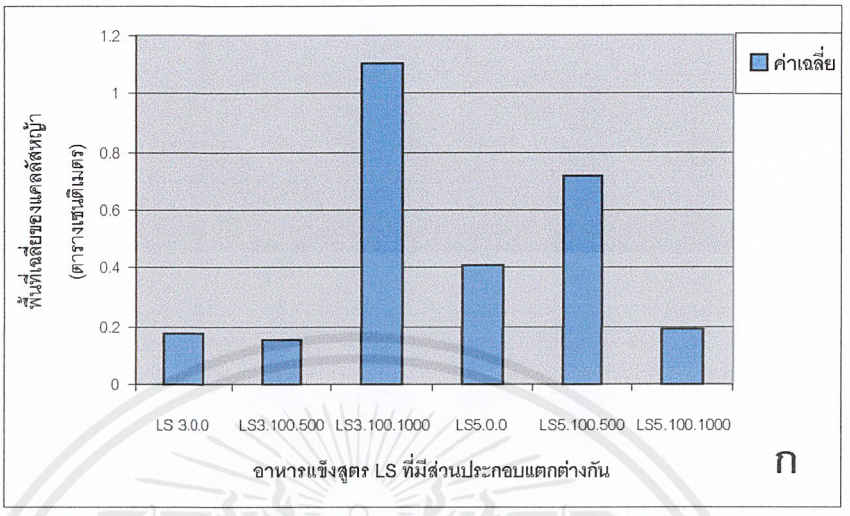
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

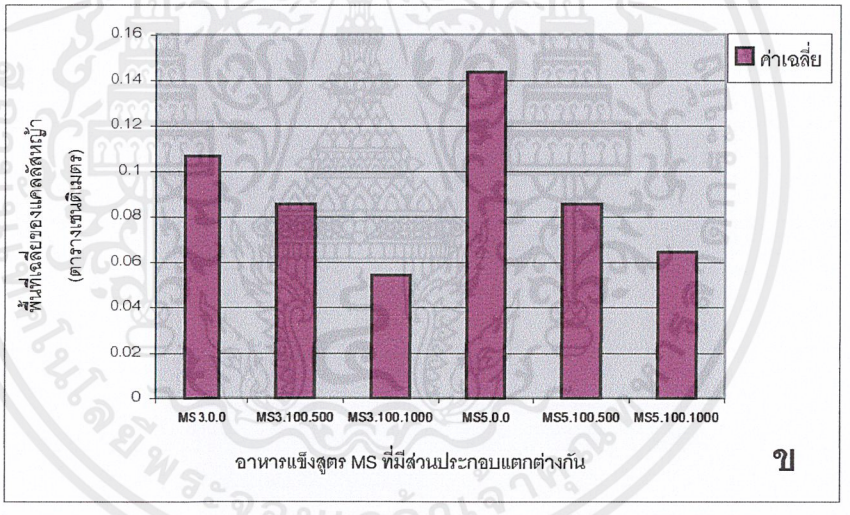
ตารางที่ 8 แสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน

แคลลัส	MS 3.0.0	MS3.100.500	MS3.100.1000	MS5.0.0	MS5.100.500	MS5.100.1000
แคลลัสที่ 1	0.0783	0.0312	0.1377	0.1672	0.0814	0.0902
แคลลัสที่ 2	0.2989	0.0792	0.0816	0.0696	0.0512	0.0504
แคลลัสที่ 3	0.2156	0.2576	0.0204	0.1152	0.0459	0.0792
แคลลัสที่ 4	0.1406	0.108	0.0836	0.1872	0.0374	0.616
แคลลัสที่ 5	0.0784	0.0624	0.0273	0.1734	0.0341	0.0448
แคลลัสที่ 6	0.0456	0.0264	0.035	0.1485	0.0372	0.0594
แคลลัสที่ 7	0.0528	0.0341	0.0375		0.0208	
แคลลัสที่ 8	0.1102		0.0135		0.1026	
แคลลัสที่ 9	0.1015		0.0513		0.0648	
แคลลัสที่ 10	0.036				0.0432	
แคลลัสที่ 11	0.0143				0.0675	
แคลลัสที่ 12					0.3564	
แคลลัสที่ 13					0.1254	
แคลลัสที่ 14					0.035	
แคลลัสที่ 15					0.1568	
แคลลัสที่ 16					0.1026	
แคลลัสที่ 17					0.0896	
รวม	1.17216	0.5985	0.4878	0.816	1.4518	0.3858
ค่าเฉลี่ย	0.10656	0.0855	0.0542	0.1435	0.0854	0.0643

หมายเหตุ หน่วยเป็นตารางเซ็นติเมตร (cm^3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



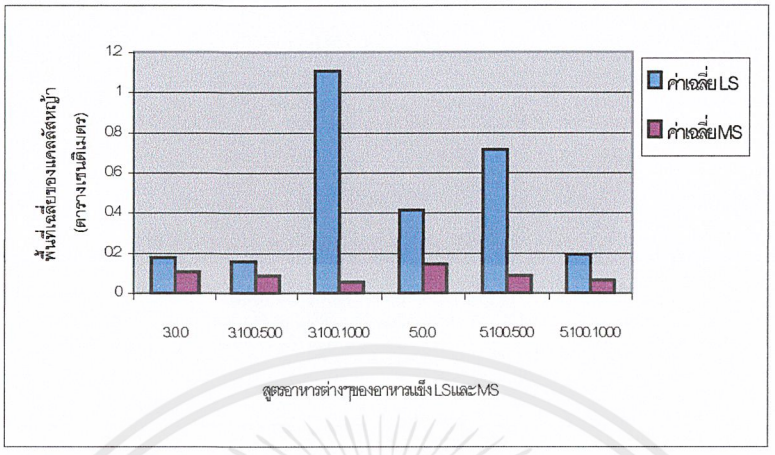


รูปที่ 2 กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน

ก. กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน

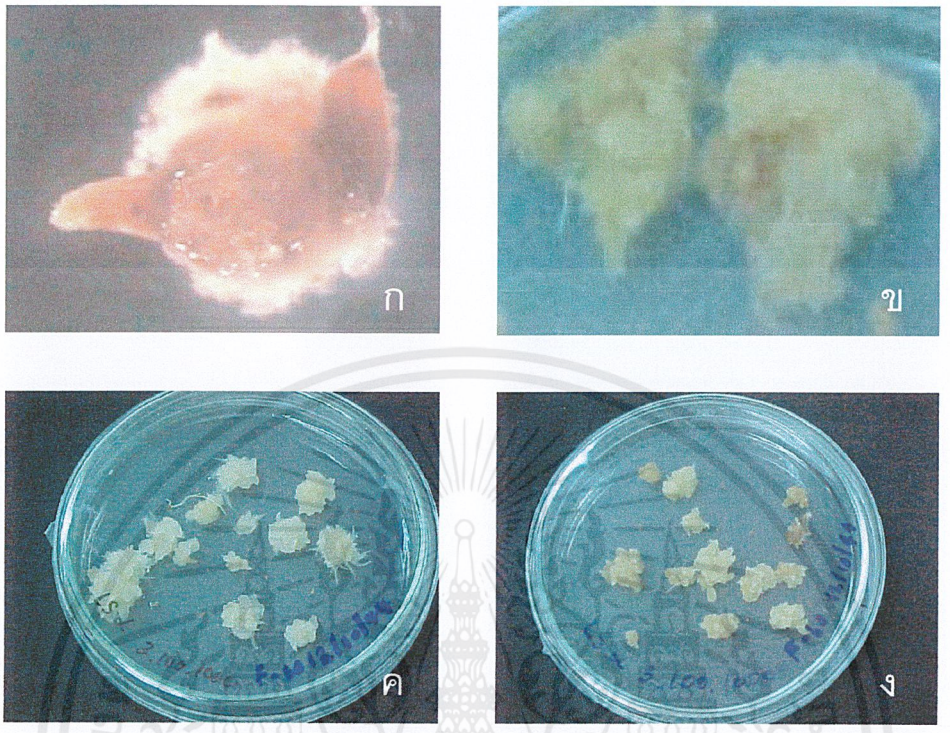
ข. กราฟแสดงพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนประกอบแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสหญ้าระหว่างอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่มีสารประกอบเหมือนกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงลักษณะแคลลัสในอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร

ก. ภาพแคลลัสอายุ 20 วัน

ข-ค. ภาพแคลลัสอายุ 45 วัน

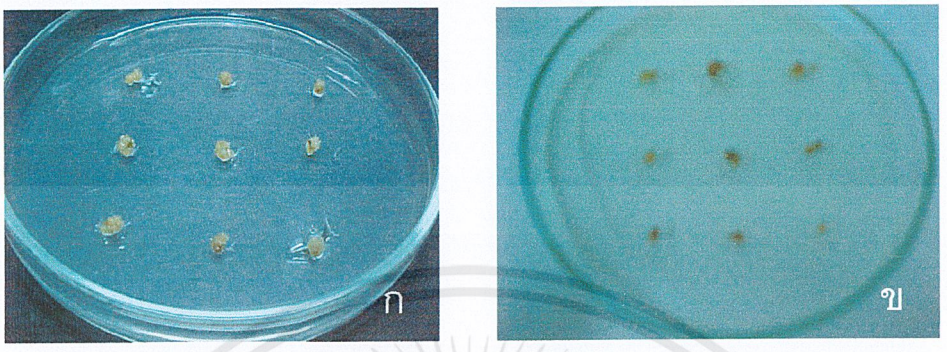
ง. ภาพแคลลัสอายุ 60 วัน

การทดลองที่ 2 การหาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี

จากการนำแคลลัสของหญ้าพันธุ์เอฟ-60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการทดลองที่ 1 เนื่องจากเป็นสูตรที่ทำให้เกิดการเจริญเป็นแคลลัสมากที่สุด และมีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันสามระดับคือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่อยู่ในอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และไฮโกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมซิน บี 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นสูตรอาหารที่ทำให้แคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตได้ สังเกตได้จากแคลลัสมีขนาดเล็กลง และสีของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีดำ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงลักษณะของแคลลัสก่อนและหลังเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. ลักษณะเริ่มต้นของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี

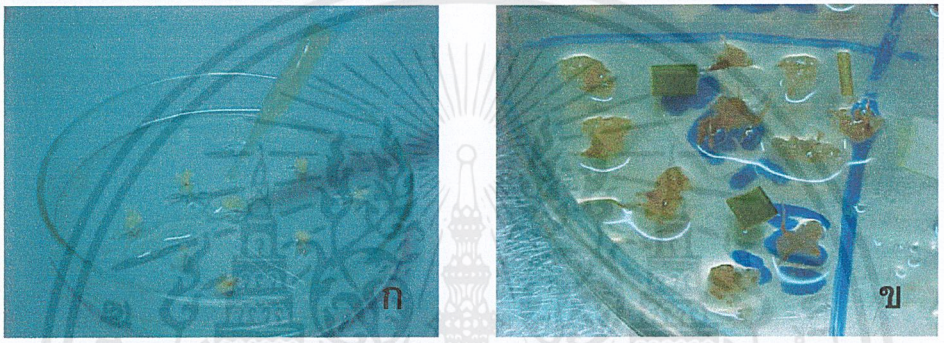
ข. ลักษณะของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนผสมของไฮโกรไมซิน บี เป็นเวลา 21 วัน

การทดลองที่ 3 การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

การหาปัจจัยที่เหมาะสมในการย้ายยีนเข้าสู่หญ้าโดยใช้อโกรแบคทีเรียม ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องดังนี้ สายพันธุ์ของอโกรแบคทีเรียม ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน และชิ้นส่วนของหญ้าที่ใช้ในการย้ายยีน โดยนำแคลลัสที่มีอายุ 45 วันและชิ้นส่วนของหญ้ามาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีส่วนประกอบ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และอะซิโตไซลิงโกนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันสองระดับคือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาหยดเชื้ออโกรแบคทีเรียม (รูปที่ 6 ก) ทั้ง 3 สายพันธุ์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้ออโกรแบคทีเรียมเจริญเติบโตปกคลุมชิ้นส่วนของหญ้า (รูปที่ 6 ข) จากนั้นนำมาตรวจสอบผลการย้ายยีน โดยสังเกตจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนแคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้าที่มีการย้ายยีนเข้าไป จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้าหลังจากหยดเชื้ออโกรแบคทีเรียมที่แตกต่างกัน 3 สายพันธุ์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีอะซิโตไซลิงโกนความเข้มข้นแตกต่างกันสองระดับ จะสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้าแตกต่างกันไป (ตารางที่ 8 ก-ง) โดยเมื่อใช้อโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 105 และอะซิโตไซลิงโกนที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนเข้าไปในแคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้าได้ดีที่สุด สังเกตได้จากการเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนของหญ้าอย่างชัดเจนและสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าทั้งในแคลลัส ข้อปล้อง และรากของหญ้า(รูปที่ 7 ก-ง) ชิ้นส่วนของหญ้าที่มีการย้ายยีนโดยอโกรแบคทีเรียมได้ดีที่สุดคือ ข้อปล้อง สังเกตได้จากพบจุดสีน้ำเงินบนข้อปล้องอย่างชัดเจนและจำนวนชิ้นที่พบมีจำนวนมากกว่าในแคลลัส ใบ และรากของหญ้า



รูปที่ 6 แสดงการหยดและการเจริญเติบโตปกคลุมชิ้นส่วนหญ้าของเชื้ออโกรแบคทีเรียม
ก. การหยดอโกรแบคทีเรียมบนแคลลัสอายุ 45 วัน
ข. การปกคลุมชิ้นส่วนพืชของอโกรแบคทีเรียมหลังบ่ม 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในแคลลัสของหญ้า

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนในแคลลัสดูจากกล้องสเตอริโอ				
			0	1	2	3	รวม
LBA 4404	50	10	9	1	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
EHA 105	50	20	8	1	1	0	10
	100	0	10	0	0	0	10

ตารางที่ 10 แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในใบของหญ้า

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอดูจากกล้องสเตอริโอ				
			0	1	2	3	รวม
LBA 4404	50	0	10	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
EHA 105	50	10	9	1	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

ระดับที่ 0 ไม่มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่าง

ระดับที่ 1 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างเล็กน้อย ต้องสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์

ระดับที่ 2 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างเล็กน้อย สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

ระดับที่ 3 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างชัดเจน สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงผลการย้ายยีนด้วเชื้ออโกรแบคทีเรียมในข้อปล้องของหญ้า

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ ดูจากกล้องสเตอริโอ				
			0	1	2	3	รวม
LBA 4404	50	20	8	1	1	0	10
	100	10	9	1	0	0	10
AGL-1	50	10	9	1	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
EHA 105	50	40	6	0	1	3	10
	100	10	9	0	1	0	10

ตารางที่ 12 แสดงผลการย้ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรียมในรากของหญ้า

สายพันธุ์ของเชื้ออโกรแบคทีเรียม	ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การย้ายยีน	ผลการย้ายยีนสู่เอ็มบริโอ ดูจากกล้องสเตอริโอ				
			0	1	2	3	รวม
LBA 4404	50	10	9	0	1	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
AGL-1	50	0	10	0	0	0	10
	100	0	10	0	0	0	10
EHA 105	50	20	8	0	1	1	10
	100	10	9	0	1	0	10

หมายเหตุ การรายงานผลการย้ายยีนซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องสเตอริโอเป็นดังนี้

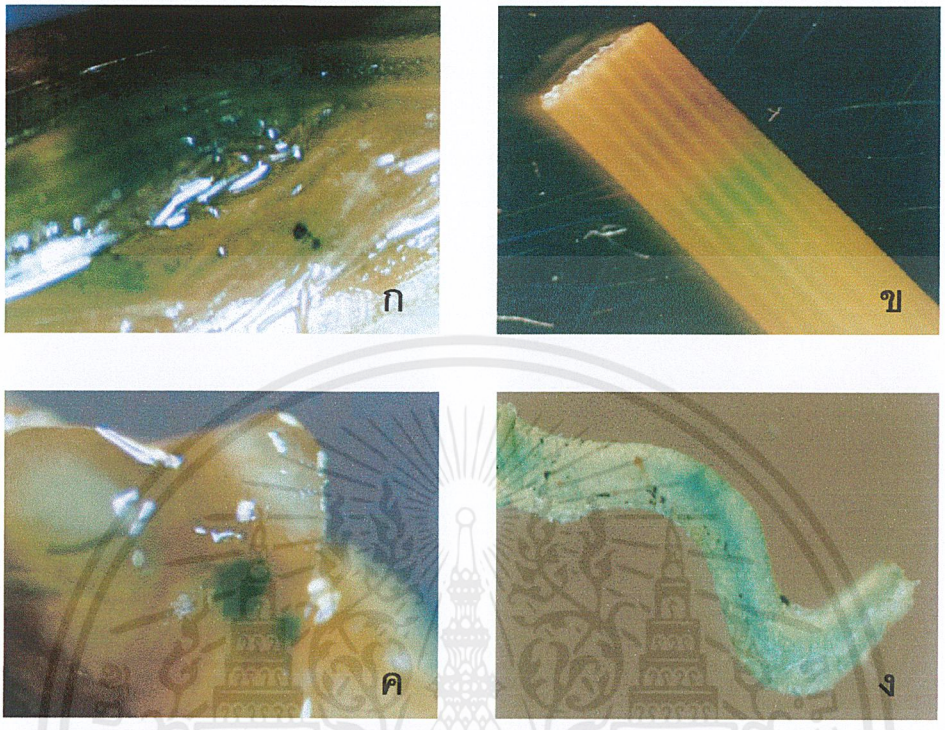
ระดับที่ 0 ไม่มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่าง

ระดับที่ 1 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างเล็กน้อย ต้องสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์

ระดับที่ 2 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างเล็กน้อย สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

ระดับที่ 3 มีจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนตัวอย่างชัดเจน สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงจุดสีน้ำเงินที่ปรากฏในแคลลัสและชิ้นส่วนพืช
ก-ข. จุดสีน้ำเงินที่ปรากฏในข้อปล้อง
ค. จุดสีน้ำเงินที่ปรากฏในแคลลัส
ง. จุดสีน้ำเงินที่ปรากฏในราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ของหญ้าในเจริญเป็นแคลลัส

จากการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอแก่ของหญ้าให้เจริญเป็นแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารแข็งสูตร LS และ MS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซทที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 0 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 คือ 0 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) การเจริญของเอ็มบริโอเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน จากการทดลองพบว่าอาหารสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร จะมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุด ดังนั้นอาหารสูตรนี้จึงเป็นอาหารที่ที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ashok และ Rongda (2000) ที่ทำการทดลองชักนำข้อปล้องของหญ้าเบอร์มิวดาให้เจริญเป็นแคลลัส ซึ่งหญ้าเบอร์มิวดาเป็นหญ้าที่อยู่ในวงศ์ย่อยเดียวกันกับหญ้าพันธุ์เอฟ-60 ซึ่งเป็นพันธุ์หญ้าญี่ปุ่น แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างแน่นอน เนื่องจากความแตกต่างของชิ้นส่วนหญ้าที่ใช้ชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส เพราะในการทดลองของเราใช้เอ็มบริโอแต่การทดลองของ Ashok และ Rongda ใช้ข้อปล้อง

การทดลองที่ 2 การหาความต้านทานของแคลลัสของหญ้าต่อไฮโกรไมซิน บี

จากการนำแคลลัสของหญ้ามาเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่ประกอบด้วยด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิดที่มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และไฮโกรไมซิน บี ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกันสามระดับ คือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าเอ็มบริโอที่อยู่ในอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะเซติคแอซิด 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และไฮโกรไมซิน บี 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นสูตรอาหารที่ทำให้แคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากแคลลัสมีขนาดเล็กลง และสีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลการทดลองคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Inokuma C. และคณะ (1998) ที่ทดลองกับหญ้าญี่ปุ่น แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของไฮโกรไมซิน บี เพียง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงไม่สามารถเปรียบเทียบได้ว่า ถ้าหากใช้ไฮโกรไมซิน บี ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วความเข้มข้นใดที่เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหยุดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่ากัน

การทดลองที่ 3 การหาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียม

จากการทดลองพบว่าอโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 105 และมีอะซิโตไซลิงโกนที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนเข้าไปในแคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้าได้ดีที่สุด ซึ่งอยู่ในระดับ 3 สังเกตได้จากการเกิดจุดสีน้ำเงินในชิ้นส่วนของหญ้าอย่างชัดเจน และสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าทั้งในแคลลัส ข้อปล้อง และรากของหญ้า แคลลัสและชิ้นส่วนของหญ้าที่มีการย้ายยีนโดยอโกรแบคทีเรียมได้ดีที่สุดคือ ข้อปล้อง สังเกตได้จากพบจุดสีน้ำเงินในข้อปล้องอย่างชัดเจนและจำนวนชิ้นที่พบมีจำนวนมากกว่าในแคลลัสและรากของหญ้า ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิงโกน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พบว่าเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการย้ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรียมนั้นสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yu T. T. และคณะ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1
แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_20$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	6.9
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14
KI	0.83
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

LS (Linsmaier and Skoog,1965)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CaCl_2.2H_20$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
KI	0.83
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Myo-inositol	100
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.4
Sucrose	30,000

N_6

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$(NH_4)_2SO_4$	463
KNO_3	2830
KH_2PO_4	400
$MgSO_4.7H_2O$	185
$CaCl_2.2H_2O$	166
$MnSO_4.4H_2O$	3.33
$ZnSO_4.7H_2O$	1.50
H_3BO_3	1.60
KI	0.8
Na_2-EDTA	37.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Glycine	2.0
Thiamine-HCl	1.00
Pyridocxine-HCl	0.50
Nicotinic acid	0.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2
วิธีการทดสอบการแสดงออกของยีนกัส

วิธีการตรวจสอบว่ามีการย้ายยีนในชิ้นส่วนหญ้าหรือไม่ สามารถทำได้โดยการตรวจสอบยีนกัสในชิ้นส่วนหญ้า ทำโดยการนำเอ็มบริโอมาตรวจด้วยสารละลายตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียม buffer solution stocks ต่อไปนี้
   1.1. Solution A ($NaPO_4$ เข้มข้น 0.2 โมลลาร์) ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 2.09 กรัม NaH_2PO_4 1.48 กรัม และ $Na_2EDTA.2H_2O$ 1.86 กรัม
   1.2. Solution B (เข้มข้น 0.1 โมลลาร์) ใน 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย $K_3Fe(CN)_6$ 0.329 กรัม
   1.3. Solution C (เข้มข้น 0.1 โมลลาร์) ใน 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ 0.422 กรัม
   1.4. Solution D (เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ใน 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย Triton X-100 10 ไมโครลิตร

   หมายเหตุ เมื่อยังไม่ใช้สารละลายให้เก็บสารละลายโดยการแช่แข็ง
2. ละลาย X-glue (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) 13 มิลลิกรัม ใน DMSO (dimethyl sulfoxide) 0.25 มิลลิลิตร
3. นำ Solution A B C และ D จำนวน 5 0.25 0.25 และ 0.003 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมลงในหลอด เติมน้ำกลั่นอีก 4.5 มิลลิลิตร
4. เขย่าส่วนผสมนี้เข้ากัน จะได้สารละลายประมาณ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองฆ่าเชื้อ
5. นำสารละลายมาใส่ให้ท่วมเอ็มบริโอ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
6. ดูดของเหลวทิ้งแล้วแช่ด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ให้ท่วม นำไปตรวจการแสดงออกของยีนกัส ซึ่งถ้ามียีนกัสจะมองเห็นเป็นสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ประสิทธิ์ ศรีอริยะวงศ์ และพงศธร กิมเฮง,2542. การย้ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง: กรุงเทพมหานคร.

รังสฤษฎ์ กาวีตั๊ะ, 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร

วิรัตน์ ภูวิวัฒน์, 2533. หญ้าสนามและสนามหญ้า. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง: กรุงเทพมหานคร

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, 2544. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง: กรุงเทพมหานคร

Ashok C. and Rongda Q., 2000. Effect of 6-Benzyladenine in callus induction medium. Plant cell, Tissue and Organ Culture 60: 113-120.

Inokuma C., Sugiura K., Imaizumi N. and Cho C., 1998. Transgenic Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) plant regenerated from protoplast. Plant Cell report. 17:334-338

Linsmaier T. T. and Skoog F., 1965. Effect of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue culture. Plant physiology 18:386

Lutfor Rahman S.M., Masumi Ebina, Yuichi Miural and Hitoshi Nakagawa, 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transformation of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud). Plant and Animal Genome VIII Conference. January 9-12.

Murashige T. and Skoog F.,1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant physiology 15:473.

Nayak S., Debata B. K. and Sahoo S., 1996. Rapid propagation of laemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Nees.) Wats.). Plant cell Report. 15:367-370.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yu T. T., Skinner D. Z., Liang G. H., Trick H. N., Huang B. and Muthukrishnan S., 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene. Hereditas 133:229-233.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้