อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวอินดิกาสายพันธุ์ไทย

EFFECTS OF DIFFERENT CARBON SOURCES ON REGENERATION EFFICIENCY OF THAI INDICA RICE

ภานุทัต ดาราฉาย
PANUTAT DARACHAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี
คณะวิทยาลัยนาโนพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558
KMITL-2015-NT-M-001-004

ห้องสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวอินดิกาสายพันธุ์ไทย

EFFECTS OF DIFFERENT CARBON SOURCES ON REGENERATION EFFICIENCY OF THAI INDICA RICE

T146101

ภานุทัต ดาราฉาย
PANUTAT DARACHAI

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 146101
วัน.เดือน.ปี 20 เม.ย. 2560

b 1283824x
i ....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี
คณะวิทยาลัยนาโนพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2558

KMITL-2015-NT-M-001-004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF DIFFERENT CARBON SOURCES ON REGENERATION EFFICIENCY OF THAI INDICA RICE

PANUTAT DARACHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY
FACULTY OF NANOTECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-NT-M-001-004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2015
FACULTY OF NANOTECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้ ... นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวอินดิกาสายพันธุ์ไทย

Thesis Title Effect of Diferent Carbon Sources on Regeneration Efficiency of Thai Indica Rices

นักศึกษา นายภานุทัต ดาราฉาย

รหัสประจำตัว 53670203

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา นาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

หมายเลขวิทยานิพนธ์ KMITL-2015-NT-M-001-004

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.สิรพัฒน์ ประโทนเทพ	
ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน	
ผศ.ดร.ดารินี พรหมโยธิน	
รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ วันพฤหัสบดีที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง ห้องประชุม ชั้น 2

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบังรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต จารุวนาวัฒน์)

คณบดี

วันที่ 24 **เดือน** กรกฎาคม **พ.ศ. 2558**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวอินดิกาสายพันธุ์ไทย
นักศึกษา	นายภานุทัต ดาราฉาย
รหัสประจำตัว	53670203
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	นาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี
พ. ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

แหล่งคาร์บอนในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและสารค้ำจุนต้นพืช นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช ชนิดของแหล่งพลังงานที่แตกต่างกัน (ซูโครส และมอลโตส) และสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง (วุ้น phytagel™ และแป้งข้าวเจ้า) นำมาเติมในอาหารชักนำแคลลัส เมล็ดที่สมบูรณ์ของข้าวอินดิกาสายพันธุ์ กข6 และ กข15 ใช้เป็นเนื้อเยื่อสำหรับการชักนำแคลลัส แคลลัสจากแต่ละวิธีการทดลองถูกนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพในการพัฒนาให้เกิดต้นใหม่ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันสองชนิด แคลลัสข้าว กข6 ที่พัฒนามาจากอาหารสูตร M2 (มอลโตส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 2 กรัมต่อลิตร และ phytagel 4 กรัมต่อลิตร) และแคลลัสข้าว กข15 ที่พัฒนามาจากอาหารสูตร M3 (มอลโตส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และ แป้ง 10 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพในการเกิดจุดเขียวและมีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ดีกว่าแคลลัสจากอาหารสูตรอื่นๆ แคลลัสข้าว กข6 และ กข15 จากอาหารสูตรข้างต้น ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว 95.83 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และข้าวสองสายพันธุ์นี้ให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สูง 68.75 เปอร์เซ็นต์ จากการชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส และ 74.72 เปอร์เซ็นต์ จากการชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส (ตามลำดับ) แคลลัสข้าว กข15 ที่พัฒนามาจากอาหารสูตร S2 และ M2 ที่มีสารค้ำจุนแบบเดียวกัน (วุ้น 2 กรัมต่อลิตร และ phytagel 4 กรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมีการนำอาหารชักนำแคลลัสที่มีสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งแบบเดียวกันนี้มาเติมแป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0 2.5 5 และ 10 กรัมต่อลิตร) แคลลัสที่พัฒนาได้จากอาหารสูตรที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ มีส่วนช่วยส่งเสริมในการเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม อาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ สามารถช่วยส่งเสริมในการเพิ่มจำนวนยอดและการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ อาหารสูตรที่เหมาะสมในการพัฒนาให้เกิดต้นของแคลลัสจากข้าว กข6 นำมาใช้ในการถ่ายโอนยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ภายหลังการถ่ายโอนยีนได้รับต้นข้าวที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่ไม่พบการถ่ายโอนยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effects of different carbon sources on regeneration efficiency of Thai *indica* rices
Student	Mr. Panutat Darachai
Student ID.	53670203
Degree	Master of Science
Program	Nanoscience and Nanotechnology
Year	2015
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

ABSTRACT

Carbon sources in tissue culture system function as a source of plant energy, supporting materials. Moreover, they also affect on plant growth and development. Different types and concentrations of energy sources (sucrose and maltose) and supporting materials (agar, Phytagel™ and rice starch) were added into callus induction media. Mature seeds of Thai *indica* rices cv. RD6 and RD15 were used as an explant for callus induction. Plant regeneration efficiency of calli from each treatment was examined in regeneration media containing two different energy sources. RD6 calli derived from the M2 medium (30 gL^{-1} maltose and 2 gL^{-1} agar + 4 gL^{-1} Phytagel™) and RD15 derived from the M3 medium (30 gL^{-1} maltose and 8 gL^{-1} agar + 10 gL^{-1} rice starch) showed relative high frequencies for green spots and shoot regenerations among treatments. The percentages of green spot in RD6 and RD15 calli were 95.83 and 100, respectively. These RD6 and RD15 calli also showed maximum percentage of plant regenerations (68.75% in RM medium and 74.72% in RS medium, respectively). RD15 calli S2 and M2 media containing the same supporting materials (2 gL^{-1} agar + 4 gL^{-1} Phytagel™) also gave high yield of plant regeneration. Thus these callus induction media with these supporting materials were added rice starch powder at various concentrations (0, 2.5, 5 and 10 gL^{-1}). Calli from media containing starch powder slightly increased percentage of plant regeneration efficiency with non-statistic difference. However, starch containing media induced an increase of shoot development into a mature plant. A suitable regenerating condition of RD6 calli were used for trial of *Agrobacterium* mediated transformation. Plantlets resisted to 40 mgL^{-1} hygromycin were derived but genetic transformation was not received.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. กนกพร สมพรไพลิน ที่ช่วยชี้แนะแนวทางในการศึกษาวิจัย ตรวจสอบและแก้ไขข้อผิดพลาด ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์วิทยาลัยนาโนพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ช่วยอบรมสั่งสอนตลอดจนให้ความรู้ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนด้วยความเต็มใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง และทุกคนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจ คอยห่วงใย และให้การสนับสนุนด้านการศึกษาเสมอมา จนสามารถประสบความสำเร็จในครั้งนี้

ภานุทัต ดาราฉาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. II

กิตติกรรมประกาศ.. III

สารบัญ.. IV

สารบัญตาราง.. VIII

สารบัญภาพ.. IX

บทที่ 1 บทนำ.. 1

1.1 ความสำคัญและที่มา.. 1

1.2 วัตถุประสงค์.. 2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน.. 2

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน.. 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.. 3

2.1 ข้าว.. 3

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.. 4

2.1.2 เมล็ดข้าวที่นำมาศึกษา.. 5

2.1.2.1 ข้าวพันธุ์ กข6.. 5

2.1.2.2 ข้าวพันธุ์ กข15.. 6

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.................. 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.. 8

ธาตุอาหาร.. 8

สารส่งเสริมการเจริญเติบโต... 8

แหล่งพลังงานของพืช... 9

2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต.. 11

ออกซิน.. 12

ไซโตไคนิน.. 12

2.2.3 ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อ.. 13

2.2.4 สภาวะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.. 13

2.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช... 13

ลักษณะทั่วไปของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม.. 15

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 15

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.. 18

3.1 พืชทดลอง.. 19

3.2 เชื้อแบคทีเรีย... 19

3.3 อุปกรณ์... 19

3.4 สารเคมี... 20

3.5 วิธีการดำเนินงาน.. 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.1 การเตรียมเมล็ด.. 21

3.5.2 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง

ต่อการเกิดเป็นต้นใหม่.. 21

3.5.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่........ 22

3.5.3.1 ข้าวสายพันธุ์ กข6.. 22

3.5.3.2 ข้าวสายพันธุ์ กข15.. 23

3.5.4 การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แคลลัสของข้าว

สายพันธุ์ไทยโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ...................................... 25

3.5.4.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แคลลัสข้าวโดยใช้เชื้อ

อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ.. 25

3.5.4.2 ตรวจสอบข้าวที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค

Polymerase chain reation : PCR.......................... 26

บทที่ 4 ผลการทดลอง.. 28

4.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง

ต่อการชักนำให้เกิดต้น.. 28

4.2 ผลของความเข้มข้นของแป้งในอาหารชักนำแคลลัสที่มีผลต่อการชักนำให้เกิด

การเจริญเป็นต้นใหม่.. 36

4.2.1 ข้าวสายพันธุ์ กข6.. 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.2 ข้าวสายพันธุ์ กข15	40
4.3 ผลการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ	44
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	46
5.1 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	46
5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้น	46
5.3 ผลของอิทธิพลจากการถ่ายโอนยีน	47
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก ก	54
ภาคผนวก ข	59
ประวัติผู้เขียน	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ความแตกต่างของข้าวพันธุ์ กข6 และข้าวพันธุ์ กข15	7
4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส (RS)	32
4.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส (RM)	33
4.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส (RS)	37
4.4 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ในอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส (RM)	38
4.5 ความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข6 ชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส	39
4.6 ความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส	42
4.7 ความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะเมล็ดของข้าว กข6..	5
2.2 แสดงลักษณะเมล็ดของข้าว กข15..	6
2.3 แสดง โครงสร้างของน้ำตาลซูโครส...	9
2.4 แสดงโครงสร้างของน้ำตาลมอลโตส..	10
2.5 แสดงโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลแพคติน..	11
2.6 กลไกการส่งถ่าย T-DNA จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียมเข้าสู่เซลล์พืช.................	14
4.1 ลักษณะของแคลลัสจากการชักนำแคลลัสในอาหารทั้ง 8 สูตรของข้าวสายพันธุ์ กข6...	29
4.2 ลักษณะของแคลลัสจากการชักนำแคลลัสในอาหารทั้ง 8 สูตรของข้าวสายพันธุ์ กข15...	30
4.3 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (S1-S4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS) หรือ มอลโตส (RM) ในข้าวสายพันธุ์ กข6..	31
4.4 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (M1-M4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS) หรือ มอลโตส (RM) ในข้าวสายพันธุ์ กข6..	31
4.5 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (S1-S4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS) หรือ มอลโตส (RM) ในข้าวสายพันธุ์ กข15..	34
4.6 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (M1-M4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS) หรือ มอลโตส (RM) ในข้าวสายพันธุ์ กข15..	34
4.7 ผลของความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมน้ำตาลซูโครส (Sa-Sd) หรือ น้ำตาลมอลโตส (Ma-Md) ต่อชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RM ในข้าวพันธุ์ กข6..	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8 ผลของความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมน้ำตาลซูโครส (Sa-Sh) ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RS ในข้าวพันธุ์ กข15........	40
4.9 ผลของความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมน้ำตาลมอลโตส (Ma-Mh) ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RS ในข้าวพันธุ์ กข15........	41
4.10 ลักษณะต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนช่วงของการชักนำให้เกิดต้นที่ในข้าวพันธุ์ กข6......	44
4.11 ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 10 วัน........	45
4.12 ผลทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการทำ PCR จากต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน ของข้าวสายพันธุ์ กข6........	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืชมีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับประชากรของโลก นักวิจัยทั่วโลกได้ให้ความสำคัญกับการพัฒนาสายพันธุ์พืชและการเพิ่มผลผลิตจากพืชมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ข้าว ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากข้าวเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรทที่ให้พลังงานและมีปริมาณแคลอรี่อยู่ประมาณ 35-70 เปอร์เซ็นต์ ประชากรในหลายๆ ประเทศ โดยเฉพาะในแถบเอเชียนิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก สายพันธุ์ข้าวที่นิยมนำมาเพาะปลูกมากที่สุดคือข้าวสายพันธุ์อินดิกา (*indica* rice) ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการผลิตและการบริโภค รวมถึงการส่งออกข้าวมากที่สุดประเทศหนึ่ง (กรมการข้าว) ดังนั้นการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะจุดประสงค์เพื่อการเพิ่มผลผลิตและเพิ่มคุณลักษณะพิเศษ การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการและใช้ระยะเวลาสั้นนั้น นิยมใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม เทคนิคนี้ต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้พืชสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวจึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของข้าวรวมถึงช่วยในการขยายพันธุ์พืชอีกหลายๆชนิดให้มีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการค้าเติบโตอย่างแพร่หลาย เช่น ในแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา ญี่ปุ่น รวมถึงประเทศไทย (รังสฤษฏ์, 2541) ทั้งนี้นักวิจัยได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยอีกหลายอย่างที่ทำให้การเพาะเลี้ยงประสบผลสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้น (Tsukahara และคณะ 1996 : Rownak และคณะ 2000) ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ ความเข้มข้นแสง ชนิดของพืช เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำเมล็ดของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ กข6 และ กข15 ในสองขั้นตอนคือการชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยมุ่งเน้นถึงการศึกษาอิทธิพลของแหล่ง คาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อศึกษาแนวทาง รวมถึงการถ่ายโอนยีนโดยเทคนิคพันธุวิศวกรรม ต่อไปในอนาคตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาชนิดของน้ำตาล (ซูโครสและมอลโตส) และสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง (วุ้น Phytagel^{TM} และ แป้ง) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวสองสายพันธุ์ (กข6 และ กข15)

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนในการชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าว 2 สายพันธุ์

1.2.3 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของข้าว 2 สายพันธุ์

1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ไทยโดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการวิจัยทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกลาเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน

รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 ปี 5 เดือน

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในช่วงของการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสของข้าวแต่ละสายพันธุ์

1.5.2 ทราบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์

1.5.3 ทราบความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวสองสายพันธุ์

1.5.4 สามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ร่วมกับงานวิจัยด้านอื่นๆในอนาคตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในตระกูลหญ้าที่สามารถรับประทานเมล็ดได้ ในข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่แตกต่างกันออกไป ลักษณะทางกายภาพของต้นข้าวประกอบด้วยใบ กาบใบ ลำต้น และราก มีลักษณะใกล้เคียงกับพืชตระกูลต้นหญ้า ข้าวป่าเป็นข้าวชนิดแรกที่มนุษย์รู้จักและนำมาทำเป็นอาหารรับประทาน ในปัจจุบันข้าวป่า ถูกพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ทำให้ได้สายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณของเมล็ดเพิ่มมากขึ้นและได้ผลผลิตที่เพิ่มมีคุณสมบัติตามความต้องการของผู้บริโภค ปัจจุบัน ข้าวที่นิยมบริโภคมีอยู่ 2 สายพันธุ์ใหญ่ๆ ได้แก่ 1.ข้าวพันธุ์ *Oryza glaberrima* พบการเพาะปลูกตามเขตเฉพาะในเขตร้อนของแอฟริกา 2. ข้าวพันธุ์ *Oryza sativa* ข้าวสายพันธุ์นี้นิยมปลูกทั่วไปในทุกประเทศ ทั้งนี้ข้าว *Oryza sativa* ยังสามารถแยกออกได้เป็น 3 สายพันธุ์ ดังนี้

1. ข้าวอินดิกา (*indica*) หรือข้าวเจ้า เมล็ดข้าวเจ้ามีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ตั้งชื่อมาจากแหล่งที่พบครั้งแรกในประเทศอินเดีย นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อนชื้น ในประเทศไทยข้าวอินดิกานิยมเพาะปลูกบริเวณที่ราบลุ่มทางตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ที่เป็นข้าวเจ้านิยมใช้ในการเพาะปลูกเพื่อการบริโภคมากกว่าข้าวเหนียว

2. ข้าวจาปอนิกา (*japonica*) เป็นข้าวเหนียวเมล็ดป้อม กลมรี มีแหล่งกำเนิดจากทางเหนือลุ่มแม่น้ำโขง นิยมเพาะปลูกแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา

3. ข้าวจาวานิกา (*javanica*) เมล็ดข้าวมีลักษณะกลมและป้อม เป็นข้าวพันธุ์ผสม ระหว่าง ข้าวอินดิกากับข้าวจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกในประเทศ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และญี่ปุ่น ข้าวจาวานิกาไม่ได้รับความนิยมในการเพาะปลูกเนื่องจากให้ผลผลิตต่ำ

ปัจจุบันหลายๆประเทศรวมถึงประเทศไทยต่างให้ความสำคัญต่อการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าว รวมถึงเพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกข้าวและวิธีการปลูกข้าวเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงและปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวมาโดยตลอด ทั่วโลกข้าวจึงมีหลากหลายพันธุ์ที่ให้รสชาติและประโยชน์ใช้สอยต่างกัน ในประเทศไทยนิยมปลูกข้าวสายพันธุ์อินดิกา ซึ่งข้าวอินดิกาแบ่งออกเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียว

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อสามัญ : rice

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Oryza sativa*

วงศ์ : Gramineae

จีนัส : Oryza

สปีชีส์ : sativa

ราก (Root)

รากคือส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน ใช้ในการยึดลำต้นกับดินเพื่อไม่ให้ต้นล้ม และอาจจะมีรากพิเศษเกิดขึ้นที่ข้อปล้องซึ่งอยู่ใกล้บริเวณผิวดิน ต้นข้าวจะไม่มีรากแก้ว แต่จะมีรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ในดิน

ลำต้น (Culm)

มีลักษณะเป็นโพรงอยู่ตรงกลางและแบ่งออกเป็นข้อปล้อง โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของแต่ละปล้องจะแตกต่างกัน จำนวนปล้องมีปริมาณเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว โดยปกติมีต้นข้าว 1 ต้น มีข้อปล้องประมาณ 20-25 ปล้อง

ใบ (Leaf)

ใบของต้นข้าวมีไว้สำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสง เพื่อเปลี่ยนแร่ธาตุ อาหาร น้ำ และ CO_2 ให้เป็นแป้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเมล็ดของต้นข้าว ใบของข้าวมีลักษณะแคบและยาว ประกอบด้วย กาบใบและแผ่นใบ ท้องใบมีสีจางกว่าด้านหลังใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ด (Seed)

เมล็ด ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) นอกจากนี้ยังมีส่วนของเมล็ดที่มีสีขาวขุ่นซึ่งเป็นส่วนที่เป็นคัพภะ (embryo) หรือเรียกว่า จมูกข้าว ส่วนคัพภะเป็นส่วนที่สามารถเจริญงอกออกมาเป็นต้นใหม่ได้เมื่อนำไปเพาะปลูกในสภาวะที่เหมาะสม

2.1.2 เมล็ดของข้าวที่นำมาใช้ในการศึกษา

เมล็ดที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นเมล็ดข้าวพันธุ์อินดิกา ประกอบด้วยข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ กข6 และ กข15 ซึ่งเป็นข้าวที่นิยมนำมารับประทาน

2.1.2.1 ข้าวพันธุ์ กข6

ข้าวพันธุ์ กข6 (RD6) เมล็ดมีลักษณะเป็นข้าวเหนียว (รูปที่ 1) ได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยการฉายใช้รังสีแกรมม่าที่ความเข้มข้น 20 กิโลแรด จนเกิดการกลายพันธุ์ของข้าว ลักษณะของต้นข้าวกข6 รูปทรงต้นข้าวเป็นกอกระจายเล็กน้อย ลำต้นแข็งแรง ต้นข้าวจะมีความสูงประมาณ 154 เซนติเมตร ใบมีลักษณะยาวสีเขียวเข้ม เมล็ดยาวเรียวเมล็ดข้าวเปลือกสีน้ำตาล ให้ผลผลิตเฉลี่ย 670 กรัมต่อไร่

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6

ที่มา : http://www.quinl.com/international/Thai+Glutinous+Rice+RD6+rice+16811.html
http://www.ricethailand.go.th/brrd/tech/RD6.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 ข้าวพันธุ์ กข15

ข้าวพันธุ์ กข15 (RD15) เมล็ดมีลักษณะเป็นข้าวเจ้า (รูปที่ 2) ได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยการฉายรังสีแกรมม่าที่ความเข้มข้น 15 กิโลแรด จนเกิดการกลายพันธุ์ ลักษณะลำต้นและใบมีสีเขียวอ่อน ลักษณะใบจะยาวค่อนข้างแคบ เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง ให้ผลผลิตต่อปี 560 กิโลกรัมต่อไร่

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของเมล็ดข้าว กข15

ที่มา: http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=1991&view=next
http://kkn-rsc.ricethailand.go.th/rice/pedigree/01/RD15.html

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความก้าวหน้าทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์ มีสำคัญที่ช่วยในการส่งเสริมขยายพันธุ์และการพัฒนาพันธุ์พืช การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ข้อ ตาข้าง ปลายยอด ราก โปรโตรพลาสต์ หรือเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้น ในอาหารนี้ประกอบไปด้วย ธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่กำหนด ให้เหมาะสมกับพืชชนิดนั้นๆ เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ความเข้มของแสงและรวมไปถึงความชื้นที่เหมาะสมในสภาวะที่ปลอดจากเชื้อโรคต่างๆ (อารีย์ วรัญญูวัฒก์ 2541) เพื่อให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นปราศจากสิ่งที่มารบกวนการเจริญเติบโตของพืช ชิ้นส่วนต่างๆของพืชนี้สามารถพัฒนาเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้โดยตรงหรือเจริญเป็นแคลลัส หรือเอมบริโอ หลังจากนั้นแคลลัสและเอมบริโอจะพัฒนากลายเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นความเจริญก้าวหน้าในด้านการเกษตรเกี่ยวกับพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1. ความแตกต่างของข้าวพันธุ์ กข6 และข้าวพันธุ์ กข15 (www.ricethailand.go.th)

ข้าวพันธุ์ กข6	ข้าวพันธุ์ กข15
การรับรองพันธุ์ - คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2520	**การรับรองพันธุ์** - คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 28 เมษายน 2521
ลักษณะพันธุ์ - เป็นข้าวเหนียว ความสูง 154 เซนติเมตร ลำต้นแข็งปานกลาง ทรงกอกระจายเล็กน้อย ใบยาวสีเขียวเข้ม ใบธงตั้ง เมล็ดยาวเรียว	**ลักษณะพันธุ์** - เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140 เซนติเมตร ลำต้นและใบสีเขียวอ่อน ใบธงทำมุมกว้างกับรวง รวงอยู่เหนือใบ ใบยาวค่อนข้างแคบ เมล็ดยาวเรียว
แหล่งเพาะปลูก - ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	**แหล่งเพาะปลูก** - ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ - ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูง ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล เป็นข้าวอายุสั้น (เก็บเกี่ยวได้เร็ว) คุณภาพหุงต้มรับประทานเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และมีกลิ่นหอม	**ลักษณะเด่นประจำพันธุ์** - ทนแล้งได้ดีพอสมควร ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล อายุสั้น(เก็บเกี่ยวได้เร็ว) คุณภาพในการหุงต้มอ่อนนุ่ม มีกลิ่น
ลักษณะด้อยประจำพันธุ์ - ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง และโรคใบไหม้ ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว	**ลักษณะด้อยประจำพันธุ์** - ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ ไม่ต้านทานแมลงบั่ว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และหนอนกอ ล้มง่าย ฟางอ่อน เมล็ดร่วงง่าย ไม่เหมาะกับนาลุ่ม
ผลผลิต - ประมาณ 670 กิโลกรัมต่อไร่	**ผลผลิต** - ประมาณ 560 กิโลกรัมต่อไร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในด้านการพัฒนาเทคนิคในการขยายพันธุ์แบบใหม่ ที่ทำให้ได้พืชต้นใหม่ จำนวนมาก อย่างรวดเร็วในเวลาที่สั้นลงและยังคงคุณลักษณะเดิมของพืชชนิดนั้นๆ (ศิวะพงศ์ 2541)

2.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อพันธุ์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และชิ้นส่วนของพืช อาหารที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควรเลือกสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ใกล้เคียงกับความต้องการของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชในสภาพธรรมชาติที่พืชต้องการ อาหารสังเคราะห์โดยทั่วไปประกอบด้วยธาตุอาหาร 2 กลุ่ม คือ ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ 2540) ได้แก่

ธาตุอาหารหลัก ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แอมโมเนียม (NH_4) แมคนีเซียม (Mg) ไนเตรต (NO_3) เป็นต้น

ธาตุอาหารรอง แมงกานีส (Mn), สังกะสี (Zn) โคบอลต์ (Co) ทองแดง (Cu) โบรอน (B) เป็นต้น

สารส่งเสริมการเจริญเติบโต (โพรลีน กลูตามีน และเคซีนไฮโดรไลเซท)

สารส่งเสริมการเจริญเติบโตกลุ่มที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ โพรลีน กลูตามีน และเคซีนไฮโดรไลเซท กรดอะมิโนเป็นแหล่งที่พืชสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง แต่อาจไม่เพียงพอกับความต้องการของพืชที่เจริญในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารเหล่านี้ช่วยในการส่งเสริมกระบวนการเกิดเอมบริโอเจเนซิส บนอาหารแข็ง มีผลในการปรับสมดุลออสโมติก (แรงดันภายในเซลล์) ในอาหารที่มีส่วนของโซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบ (Gupta และคณะ 1995)

ทั้งนี้สารเหล่านี้ยังมีส่วนช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนแคลลัสให้มากขึ้น และกระตุ้นกระบวนการเอมบริโอเจเนซิสให้กลายเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัส (Al-Khayri และ Bahrany 2002) และยังมีผลในการช่วยยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล (browning) ตรงบริเวณส่วนที่แคลลัสสัมผัสกับอาหารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลานานได้ (Ali และคณะ 2004)

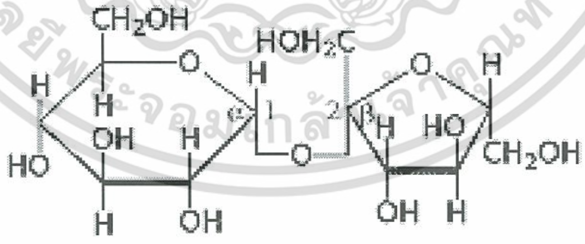
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งพลังงานของพืช

พืชใช้พลังงานจากแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำให้สามารถพัฒนาและเจริญเติบโตได้ แหล่งคาร์บอนหลักที่ใช้ให้พลังงานกับพืช คือ แป้ง และน้ำตาล ชนิดน้ำตาลจำแนกตามโครงสร้างเป็น 2 ชนิด คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส (glucose) กาแลกโตส (galactose) และฟรุคโตส (fructose) น้ำตาลโมเลกุลคู่หรือไดแซคคาไรด์ เกิดจากเกิดจากการรวมตัวกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 โมเลกุล เช่น มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) และ แลคโตส (Lactose) การทดลองนี้ใช้น้ำตาล 2 ชนิด ได้แก่

น้ำตาลซูโครส (Sucrose)

น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทราย มีสูตรโครงสร้างของโมเลกุล $C_{12}H_{22}O_{11}$ (รูปที่ 2.3) น้ำตาลซูโครสหรือไดแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล และน้ำตาลฟรุคโตส 1 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ แอลฟา 1, 2 ไกลโคซิดิก (α1, 2 glycosidic bond) และพันธะไฮโดรเจน (-H) พืชสามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้รวดเร็วทำให้พืชสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้เร็วขึ้น (Zaida และคณะ 1995) ความเข้มข้นที่สูงของน้ำตาลซูโครสมีผลยับยั้งการเกิดและพัฒนาแคลลัสของพืช (Ali และคณะ 2004) เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลส่งผลต่อการเกิดแรงดันออสโมติกภายในเซลล์พืช (Al-Khayri และ Al-Bahrany 2002)



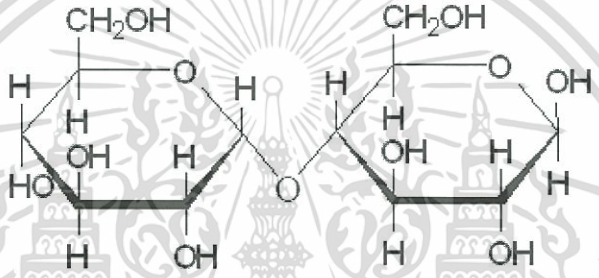
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของน้ำตาลซูโครส

ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0978/sucrose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลมอลโตส (Maltose)

น้ำตาลมอลโตส มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{12}H_{22}O_{11}$ เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยน้ำตาล กลูโคส 2 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1, 4 ไกลโคซิดิก (α1, 4 glycosidic bond) ระหว่างหมู่ -OH ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาลตัวแรกกับหมู่ -OH ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของน้ำตาลตัวที่สอง (รูปที่ 2.4) แต่ได้จากการย่อยสลายของแป้ง (starch) ด้วยกรด (acid) หรือ เอนไซม์ (enzyme) เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทั้งนี้มอลโตสยังมีส่วนช่วยให้ระยะเวลาของการเกิดแคลลัสและการเกิดจุดเขียวสั้นลง (Zaidi และคณะ 2006) และยังมีผลต่อการยับยั้งแรงดันออสโมติกที่ขึ้นภายในของเซลล์พืช (Zaida และคณะ 1995)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของน้ำตาลมอลโตส

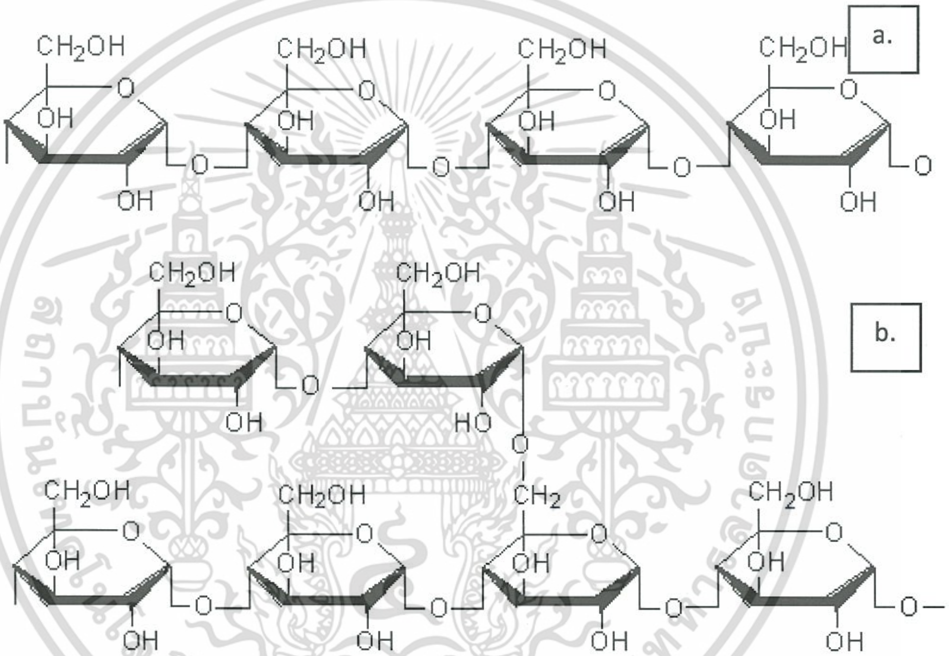
ที่มา: http://www.nmt.ac.th/home/chemistry/pic/maltose.gif

สารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง

องค์ประกอบของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งช่วยให้รากของพืชยึดเกาะและไม่ทำให้ชิ้นส่วนของพืชจมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง สารนี้มีคุณสมบัติก่อให้เกิดเจลที่เข้มข้น จนมีความหนืดค่อนข้างสูง เมื่อได้รับความร้อนและทำให้เย็นลงกลายเป็นอาหารแข็ง โมเลกุลของสารมีโครงสร้างเป็นลักษณะตาข่าย ได้แก่ สารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง วุ้น Phytagel™ และแป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า เป็นต้น แป้งเมื่อถูกผสมในอาหารและมีการให้ความร้อนกับอาหาร จะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในของโมเลกุลของสาร เพราะภายในแป้งประกอบไปด้วยเม็ดแป้งภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยสายโพลีแซคคา-ไรด์ (Polysaccharide) ของอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) โมเลกุลของอะไมโลสและและอะไมโลเพกตินจะต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1-4 ไกลโคซิดิก (α 1-4 glycosidic bond) (Miles และคณะ 1985) อะไมโลแพคตินแตกต่างจากอะไมโลส ตรงที่อะไมโลแพคตินจะมีกิ่งก้านของน้ำตาลแตกออกมาจากสายโซ่หลัก และจับกับสายโซ่น้ำตาลด้วยพันธะ พันธะแอลฟา 1-6 ไกโคซิดิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(α 1-6, glycosidic bond) (Chetham 1998) (รูปที่ 2.5) ซึ่งโครงสร้างทั้งสองของแป้งมีผลในการเพิ่มความหนืดในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนผสมอยู่ ความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเม็ดแป้งทำให้เกิดการพองตัวและคลายตัวออกส่งผลให้เกิดความหนืดเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิที่สามารถทำให้แป้งเกิดการหลอมรวมและหนืดเรียกว่า gelatinization temperature หรือ pasting temperature ซึ่งปรากฏการณ์นี้คือการสุกของแป้งในช่วงอุณหภูมิขึ้นถึงจุดเดือดจากการให้ความร้อนในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอะไมโลส (a) และอะไมโลแพคติน (b)

ที่มา: http://www.chemsoc.org/networks/learnnet/cfb/images/amylopectin.gif

2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (พีรเดช 2529)

สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสารภายในพืชที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมเจริญเติบโตของพืชในแต่ละส่วน เช่น ตาข้าง ยอด ใบ และราก ปัจจุบันสารควบคุมการเจริญเติบโตมีทั้งชนิดที่กระตุ้นการเจริญเติบโต และยับยั้งการเจริญเติบโต สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พบในปัจจุบันคือ ออกซิน (Auxin) ไซโตไคนิน (Cytokinins) จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) กรดแอบซิสิค (Abscisic Acid, ABA) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทธิลีน (Ethylene) ซึ่งมีสภาพเป็นก๊าซ นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ สารควบคุมที่นิยมใช้ คือสารในกลุ่ม ออกซิน และไซโตไคนิน สารออกซินที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งเสริมการเกิดรากพืช ในขณะเดียวกันการใช้ไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงจะชักนำให้เกิดยอด การใช้ระดับความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในอัตราที่พอเหมาะกับชนิดของพืช จะชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชพัฒนาเป็นแคลลัสหรือเป็นต้นอ่อน (embryo) ได้

ออกซิน (Auxins)

เป็นกลุ่มของสารที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) ช่วยเร่งการแบ่งตัวของเซลล์พืช ทำให้เกิดการเจริญเติบโต ช่วยในการเกิดราก ขยายขนาดของผล ช่วยป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล รวมถึงช่วยในการยับยั้งการแตกตาข้าง ฮอร์โมนกลุ่มนี้ชนิดที่พืชสามารถสร้างขึ้นเองได้ เช่น กรดอินโดอะซิติก (indoacetic acid; IAA) พบมากที่บริเวณส่วนปลายของยอดและราก และบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ปริมาณฮอร์โมน IAA ภายในเนื้อเยื่อพืชแต่ละส่วนมีมากน้อยแตกต่างกันไป โดยจะพบอยู่มากในส่วนที่กำลังเจริญเติบโต ความเข้มข้นของออกซินที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหนึ่งอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อชนิดอื่นได้ (นพดล 2536) ดังนั้นการรักษาระดับปริมาณออกซินภายในเนื้อเยื่อพืชถูกควบคุมโดยระบบการสร้างและการทำลายพร้อมๆกันไป เนื้อเยื่อที่มีการพัฒนาเจริญเติบโตจะมีการสร้างออกซินมากกว่าการทำลาย และในทางตรงกันข้าม ในเนื้อเยื่อที่มีอายุจะมีการทำลายมากกว่าการสร้างสารออกซิน สารสังเคราะห์อยู่กลุ่มออกซิน ที่นิยมใช้กันมากได้แก่ กรดแอลฟานาฟเทอลีนอะซีติก (α- Naphthaleneacetic acid, NAA) กรดอินโดบิวทิริก (Indobutaric acid, IBA) กรดคลอโรฟีนอกซี่อะซีติก (4 Chlorophenoxy acetic acid, 4-CPA) 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4-D)

ไซโตไคนิน (Cytokinins)

ฮอร์โมนกลุ่มนี้ช่วยในเรื่องของการแบ่งเซลล์ของพืช ชะลอการแก่ชราและกระตุ้นการแตกตาข้างรวมถึงการเกิดยอด พบมากในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ ในคัพภะ (embryo) และราก (สมบุญ 2544) ไซโตไคนินมีการลำเลียงได้น้อย แต่มีคุณสมบัติที่สำคัญคือช่วยในการดึงสารอาหารต่างๆ มายังแหล่งที่มีฮอร์โมนไซโตไคนินสะสมอยู่ (cytokinin induced translocation) ฮอร์โมนกลุ่มนี้ที่พบในพืชได้แก่ ซีเอติน (Zeatin) ส่วนสารสังเคราะห์ที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BAP) ไคเนติน (Kinetin, Kn)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชิ้นส่วนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง โดยชิ้นส่วนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ขึ้นอยู่กับอายุ และชนิดพืชที่นำมาเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่เอ็มบริโอ ปลายยอด ตายอด ตาข้าง ใบอ่อน เป็นต้น การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อควรเลือกให้ตามวัตถุประสงค์การทดลอง

2.2.4 สภาวะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

พืชสามารถสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตในสภาวะที่เหมาะสม ปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ที่สำคัญ คือ แสง อุณหภูมิ การให้แสงและอุณหภูมิขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการให้แสงพอเหมาะอยู่ที่ประมาณ 12-16 ชั่วโมง ความเข้มแสง ที่ 1,000- 3,000 Lux และอุณหภูมิ ประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

2.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายโอนยีนสามารถปฏิบัติได้หลายวิธี เช่น การส่งถ่ายยีนโดยตรง และการส่งถ่ายยีนโดยใช้พาหะ วิธีที่นิยมใช้ในการถ่ายโอนยีนและประสบความสำเร็จอย่างมากในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช และให้ผลดีในการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของพืช คือ การส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นพาหะ อาศัยกลไกการเข้าทำลายพืชบริเวณบาดแผล โดยสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชทำให้พืชเกิดโรคแสดงลักษณะปุ่มปม ที่เรียกว่า crown gall พลาสมิด Ti ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีการส่งถ่ายชิ้นส่วนของ T-DNA (Transferred DNA) เข้าไปแทรกในเซลล์พืช พลาสมิด Ti ที่พบมี 2 ชนิด คือ ออกโทปีน (Octopine) หรือโนปาลีน (Nopaline) พลาสมิด Ti จะมีกลุ่มของ Virulence (Vir) gene ที่ช่วยในการชักนำชิ้นส่วน T-DNA ให้เข้าไปในเซลล์พืช (Rossi และคณะ 1998) ดังนี้

Vir A หน้าที่จดจำสารในกลุ่มของสารฟีนอลิกที่พืชสร้างขึ้นขณะได้รับบาดแผล และกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Vir* G

Vir B ช่วยในการส่งถ่าย T-DNA สายเดี่ยว

Vir C ทำหน้าที่เพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ T-DNA สายเดี่ยว

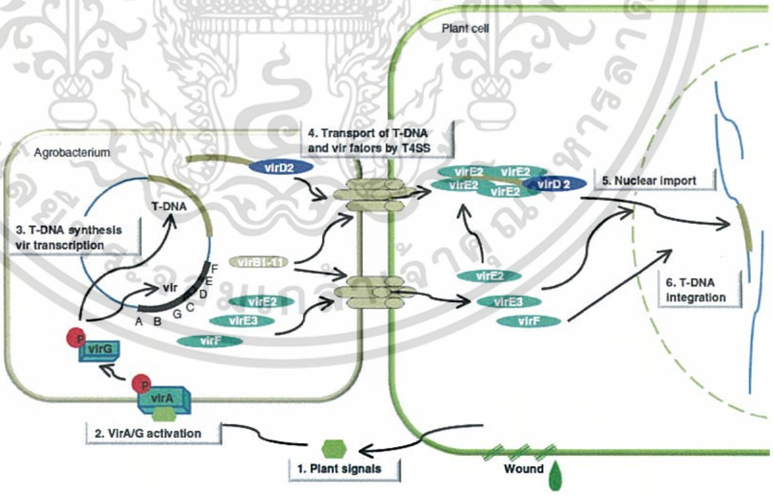
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vir D ทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ที่ขอบเขตทางด้านซ้ายและขวาของ T-DNA และช่วยส่งดีเอ็นเอผ่านช่องว่างบนเนื้อเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear pore)

Vir E ทำหน้าที่ช่วยจับ T-DNA สายเดี่ยว และป้องกันการถูกย่อยด้วยนิวคลีเอส (nuclease) และทำให้ T-DNA สายเดี่ยวมีความคงตัวในระหว่างการส่งผ่าน และหลังการส่งถ่ายยีน

Vir G หน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัสของยีนอื่นๆ ในกลุ่ม

T-DNA ที่อยู่ในพลาสมิดของอะโกรแบคทีเรียม มีโครโมโซมเหมือนของพืช แต่ยีนเหล่านี้จะไม่มีการแสดงออกในเซลล์ของ อะโกรแบคทีเรียม แต่เมื่อ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชยีนเหล่านี้จะแสดงออกหลังได้รับการถ่ายโอน T-DNA โดยในยีนเหล่านี้มีจะมีโปรโมเตอร์ (promoter) และ เทอร์มิเนเตอร์ (terminator) ของพืช (รูปที่ 2.6) การนำเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด Ti เป็นตัวถ่ายฝากยีน ทำได้โดยนำส่วนของยีนที่ทำให้เกิดโรคออก และแทนที่ด้วยยีนที่จะทำการศึกษา เมื่อทำการถ่ายฝากยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม T-DNA จะเข้าไปสู่เซลล์พืชทำให้พืชแสดงลักษณะยีนที่ใส่ไว้แทน วิธีการนี้ทำได้โดยนำเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมาเลี้ยงร่วมกับชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ แคลลัส เป็นต้น ที่ตัดหรือทำให้มีบาดแผล (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)



รูปที่ 2.6 แสดงกลไกการส่งถ่าย T-DNA จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียมเข้าสู่เซลล์พืช

ที่มา: http://uvmgg.wikia.com/wiki/Agrobacterium_tumefaciens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทั่วไปของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

อะโกรแบคทีเรียม หรือ *Agrobacterium tumefaciens* จัดอยู่ในตระกูล Rhizobiaceae ประกอบด้วย 2 สกุล คือ Agrobacterium และ Rhizobium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อาศัยอยู่ในน้ำหรือในดิน สามารถเคลื่อนที่ได้โดยการใช้แฟลกเจลลา (flagella) ไม่มีการการสร้างสปอร์ (spore) ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ รูปร่างลักษณะของเชื้อจะเป็นท่อนตรง และเมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบจะสร้างเมือกเหนียวๆ ขึ้นรอบๆ เซลล์ ลักษณะโคโลนีของเชื้อ มีลักษณะผิวที่เรียบ ไม่มีสี บางสายพันธุ์โคโลนีมีผิวขรุขระ มีความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญเจริญเติบโตได้ดีอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส มีความในการสามารถเข้าบุกรุกและทำลายพืชได้ทางบาดแผล เป็นสาเหตุของโรคพืช มีผลทำให้เซลล์บริเวณที่เชื้อเข้าไปนั้นมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดเป็นลักษณะปุ่มปมคล้ายกับการเกิดเนื้องอกเรียกบริเวณนี้ว่า crown gall ลักษณะปุ่มปมนี้สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วโดยไม่มีข้อจำกัด อีกทั้งยังทำให้การเจริญของเซลล์ในชั้นของคอร์เทกซ์ (cortex cell) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว พบได้เชื้อนี้ได้บริเวณรากและลำต้นของพืช

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จนถึงปัจจุบันมีงานวิจัยหลายงานที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ประภาและพรทิพย์ (2537) ได้ทำการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซท ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในอาหารสูตรนี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 96.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาดแคลลัสเฉลี่ยอยู่ที่ 9.4 มิลลิเมตร จากนั้นแคลลัสจะถูกดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการพักแคลลัสไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแคลลัสถูกย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร พบว่า แคลลัสที่ผ่านการดึงน้ำออกสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการดึงน้ำออก การทดลองนี้พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาและเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดคืออาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดสู่สุด 45.8 เปอร์เซ็นต์ ยอดเฉลี่ยแต่ละแคลลัส 7.9 ยอด

Masayoshi และคณะ (1996) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบเซลล์แขวนลอย โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนรวมถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนและส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารสูตร N6 ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นใหม่ พบว่าที่ความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่รวมถึงสารประกอบตัวอื่นและปริมาตรของอาหารที่ใช้มีผลต่อการส่งเสริมการพัฒนาเป็นต้นพืช

Kyungsoon และคณะ (2002) ศึกษาหาความเหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพของแคลลัสข้าวในการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอาหาร 3 สูตร (LS MS และN6) ในการเลี้ยงข้าว 3 สายพันธุ์ (Dong-Jin Hwa-Chung และ Nak-Dong) ในการชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดเป็นแคลลัสด้วยความเข้มข้น 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร N6 (73 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของของแหล่งคาร์บอนและปริมาณสารยึดเกาะรวมถึงการใช้ฮอร์โมนร่วมกันระหว่างออกซิน (NAA) และไซโตไคนิน (BA หรือไคเนติน) ในการชักนำให้เกิดต้น ปรากฏว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นใหม่สูงในข้าวสายพันธุ์ Nak-Dong (41 เปอร์เซ็นต์) แต่ในข้าวอีกสองสายพันธุ์ (Dong-Jin และ Hwa-Chung) น้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตรให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นสูงสุด ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่ 1.6 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเกิดยอดสูงที่สุดในข้าว 3 สายพันธุ์ ข้าวในแต่ละพันธุ์มีการใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แตกต่างกันเช่นในข้าวพันธุ์ Dong-jin ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสม ของ Dong-Jin, Hwa-Chung และ Nak-Dong คือ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ร่วมกับไคเนติน 2 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

พิพัทธิ์ พานุกูล และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ กข6 ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยเลี้ยงในอาหารดัดแปลง N6 ชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ฮอร์โมน 2-4,D ความเข้มข้น 22.5 ไมโครโมล่าร์ และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ 97 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้โดยย้ายแคลลัสลงอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ฮอร์โมน IAA ความเข้มข้น 22.5 ไมโครโมล่าร์ และ BA ความเข้มข้น 18 ไมโครโมล่าร์ และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร

จากงานวิจัยของ Kartjikeyan และคณะ ได้ทำการศึกษาวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพของการชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวและเกิดการพัฒนาให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยการใช้ฮอร์โมนออกซินและ ไซโตไคนินร่วมกัน รวมไปถึงศึกษาระยะเวลาในการชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ผลปรากฏว่าฮอร์โมน ฮอร์โมน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพในการเกิดเป็นแคลลัสสูงสุดที่ 78 เปอร์เซ็นต์ ในการพัฒนาให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่สูงที่สุดในอาหารที่มี BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพในการเกิดต้นอยู่ที่ 86 เปอร์เซ็นต์ จากการเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน ขณะเดียวกันที่ระยะเวลา 40 วันประสิทธิภาพการเกิดต้นจะลดลง ดังนั้นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพในการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Ali และคณะ (2004) ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าว 2 สายพันธุ์ คือ Xiushi 11 และ XC 95 พบว่า ความเข้มข้นของ Phytagel มีส่วนช่วยในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของแคลลัส ในข้าวสายพันธุ์ Xiushi 11 ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด (41.3เปอร์เซ็นต์) ในอาหาร Phytagel ความเข้มข้น 0.5 % ส่วนแคลลัสข้าวสายพันธุ์ XC 95 ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงสุด (36.3 เปอร์เซ็นต์) ในอาหารที่มี Phytagel ความเข้มข้น 0.6 %

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพและการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการถ่ายโอนยีนในข้าว ยกตัวอย่างเช่น

Hoque และคณะ 2005 ทำการศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนลงในข้าวบังกลาเทศ สายพันธุ์ BR22 BRRI Dthan 29 BR5842 และ Moulata และข้าวจาโปนิกาสายพันธุ์ Taipei 309 รวมถึงศึกษาอายุแคลลลัสและระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ผลปรากฏว่า อายุแคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายโอนยีนอยู่ในช่วง 3 สัปดาห์หลังจากการชักนำให้เกิดแคลลัส ความเข้มข้นของอะซิโตไซริงโกน ที่ 200 ไมโครโมล่าร์ ให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนที่ดีที่สุด ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ที่ระยะ 3 วัน จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนที่ดีที่สุดและให้การแสดงออกของยีนกัส (Gus histochemical assay : GUS) ได้ดีที่สุด

Zaidi และคณะ 2006 ได้ทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ซูโครส มอลโตสและกลูโคส) และสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง จากการทดลองพบว่า การใช้น้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดและสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ที่ 92 และ 46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ วุ้นที่ใช้ทำให้เป็นเป็นอาหารกึ่งแข็ง ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นสูง 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเติมสารประกอบเคซีนไฮโดรไลเซทในช่วงของการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ให้ประสิทธิภาพที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติม และการเติมช่วงใดช่วงหนึ่งของการชักนำแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ (40 เปอร์เซ็นต์)

Ishizaki และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการถ่ายโอนยีนลงในแคลลัสข้าว NERICA โดยได้ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ร่วมกับการใช้เวกเตอร์ 2 ชนิดในการทดสอบการส่งถ่ายยีนลงในข้าว เวกเตอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คือ pIG121hm และ pBIG-ubi : GUS โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัส ผลปรากฏว่าเวกเตอร์ทั้ง 2 ชนิด มีการส่งถ่ายยีนไปยังต้นข้าวหลังจากที่ได้รับการถ่ายโอนยีน เวกเตอร์ที่ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนได้ดีที่สุดคือ pBIG-ubi : Gus ให้จำนวนต้นที่สูงกว่าเวกเตอร์ pIG121hm ภายหลังจากผ่านการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเช็คการส่งถ่ายทอดยีนสู่รุ่นลูกในรุ่น T_1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

146101

โดยสกัดดีเอ็นเอจากใบรุ่น T_1 พบว่ามีการถ่ายทอดยีนดังกล่าวจากรุ่น T_0 สู่รุ่น T_1 ซึ่งการถ่ายทอดลักษณะนี้เป็นไปตามกฎของเมนเดล

Khirod และคณะ (2011) ศึกษาการพัฒนาการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่หลังการถ่ายโอนยีนด้วยเชื้อเชื่ออะโกรแบคทีเรียมพบว่า ความเข้มข้นของ agarose 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตรเป็นส่วนประกอบให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นสูง 84-92 เปอร์เซ็นต์

จากการรายงานของคณะ Zhao และคณะ 2011 ได้ทำการศึกษาถ่ายโอนยีนด้วยเชื้ออะโกร-แบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 พลาสมิด pCAMBIA1381 ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในข้าวสายพันธุ์ Handao 297 ผลปรากฏว่าอาหารที่ให้ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด คือ อาหารสูตร N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้น 81.2 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนช่วยส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาให้เกิดยอดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรที่เหมือนกันแต่ไม่มีการเติมฮอร์โมน TDZ ลงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชทดลอง

ข้าวพันธุ์อินดิกา สายพันธุ์ กข6 (RD6)

ข้าวพันธุ์อินดิกา สายพันธุ์ กข15 (RD15)

3.2 เชื้อแบคทีเรีย

อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ภายในบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1301

3.3 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งอิเล็กโทรนิค (HR-200; AND®, Japan)

2. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow BC-01E; Jeio Tech®, Korea)

3. เครื่องปรับค่าความเป็นกรดด่าง (PL-600; Ezdo®, Taiwan.)

4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (TOMY EX-315; TOMY®, Japan)

5. ไมโครเวฟ (Microwave oven EM-T856c; Sanyo®, Thailand)

6. เครื่องเขย่า (Shaker; Biosan®, Germany)

7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Analytik Jena AG; SPEKOL 1500®, Germany)

8.เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis; Lab Net®, USA)

9. เครื่องถ่ายรูปเจล (DI-01; MS Major Science®, USA)

10. ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มืด 8 ชั่วโมงต่อวัน และชั้นมืด

11. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (TOMY MX-305; TOMY®, Japan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. Water Bath (LCB 0725; LAUDA®, Germany)

13. เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (Master cycler; Mondo Tech®, Thailand)

14. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่นๆ เช่น มีดผ่าตัด แท่งแก้วคนสาร ปากคีบ บีกเกอร์ ปิเปต หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อกระบอกตวง ขวดแก้วบรรจุอาหารขนาด 4 และ 8 ออนซ์พร้อมฝาปิด ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตะเกียงแอลกอฮอล์ และ พาราฟิล์ม

3.4 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร N6 basalt medium และ วิตามิน B5 (Li และคณะ 1993) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย Potassium hydroxide (KOH) และ Hydrochloric acid (HCl)

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Amino Acid Medium : AAM (Toriyama and Hinata 1985) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย Sodium hydroxide (NAOH) และ Hydrochloric acid (HCl)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Luria Broth : LB (Sambrook และ Russel, 2001) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย sodium hydroxide (NaOH) และ hydrochloric acid (HCl)

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ kinetin IAA BA และ 2,4-D

5. ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ไฮโกรมัยซิน และซีโฟแทกซีม

6. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

7. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด Genomic DNA จากพืช

8. สารเคมี 3,5 Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon (อะซีโตไซริงโกน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการดำเนินงาน

3.5.1 การเตรียมเมล็ด

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด นำเมล็ดข้าวอินดิกาสายพันธุ์ กข6 และ กข15 มาแกะเปลือกออก (ระวังอย่าให้จมูกข้าวหลุดออก) จากนั้นทำการคัดเมล็ดที่เกิดโรคและเมล็ดที่เจริญยังไม่เต็มที่ออก เมล็ดที่ผ่านการคัดเลือดนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวนอกโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เติมสารลดแรงตึงผิว tween-80 จำนวน 2-3 หยด นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 40 นาที ทำการฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ของไฮเตอร์ เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาล้างด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้งซับเมล็ดให้แห้งโดยวางบนกระดาษกรอง

3.5.2 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งต่อการเกิดเป็นต้นใหม่

นำเมล็ดข้าวที่ได้จากการเตรียมเมล็ดมาเลี้ยงบนอาหาร NB (ภาคผนวก ก) ที่เติมกลูตามีน (glutamine) 500 มิลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (proline) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท (Casein hydrolysate) 300 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไคเนติน (Kinetin) 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยอาหารในแต่ละสูตรจะประกอบไปด้วยชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ร่วมกับการใช้สารยึดเกาะต่างชนิดกัน ดังนี้

S1 คือ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

S2 คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel™ 4 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

S3 คือ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

S4 คือ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

M1 คือ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

M2 คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel™ 4 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

M3 คือ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

M4 คือ วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในสภาวะมืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและบันทึกผล ลักษณะการยึดเกาะตัวของแคลลัส และสีของแคลลัสในการทดลองนี้วางแผนแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ขวด

นำแคลลัสที่ได้จากอาหารทั้ง 8 สูตร จากการทดลองที่ 3.5.2 มาพักบนกระดาษกรองที่วางในจานเพาะเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่ 2 สูตร ดังนี้

Regeneration in Sucrose (RS) คือ อาหารสูตร NB ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Regeneration in Maltose (RM) คือ อาหารสูตร NB ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

จากนั้นเลี้ยงโดยการให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลจำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอด วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan’s new multiple-range test (DMRT)

3.5.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่

อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเจริญเป็นต้นใหม่จากการทดลองที่ 3.5.2 มาใช้เป็นอาหารสูตรพื้นฐานในการศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งและชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข6และ กข15 โดยแบ่งการทดลองตามสายพันธุ์ของข้าวได้ดังนี้

3.5.3.1 ข้าวสายพันธุ์ กข 6

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร NB ที่เติมกลูตามีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 300 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไคเนติน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ประกอบไปด้วยความเข้มข้นของแป้งและชนิดของน้ำตาลที่แตกต่างกัน ดังนี้

Sa คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel™ 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sb คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Sc คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 5.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Sd คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 10.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Ma คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

Mb คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

Mc คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 5.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

Md คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 10.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในสภาวะมืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้มาพักบนกระดาษกรองที่วางในจานเพาะเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่สูตรที่ดีที่สุดในข้าวสายพันธุ์ กข6 จากการทดลองที่ 5.3.3 ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผล จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอด วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan’s new multiple-range test (DMRT) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ขวด

3.5.3.2 ข้าวสายพันธุ์ กข15

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร NB ที่เติมกลูตามีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 300 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไคเนติน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ประกอบไปด้วยความเข้มข้นของแป้งและชนิดของน้ำตาลที่แตกต่างกัน ดังนี้

Sa คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sb คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

Sc คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 5.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

Sd คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 10.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร

Se คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Sf คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Sg คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 5.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Sh คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 10.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

Ma คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร

Mb คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร

Mc คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 5.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร

Md คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 10.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร

Me คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

Mf คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

Mg คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 5.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mh คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร แป้ง 10.0 กรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร

จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในสภาวะมืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้มาพักบนกระดาษกรองที่วางในจานเพาะเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่สูตรที่ดีที่สุดในข้าวสายพันธุ์ กข6 จากการทดลองที่ 5.3.3 ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผล จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่ วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT) การทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ๆ ละ 15 ขวด

3.5.4 การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แคลลัสของข้าวสายพันธุ์ไทยโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

3.5.4.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แคลลัสข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

ทำการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 (ภาคผนวก ข) ในอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรเดียวกันปริมาตร 3 มิลลิลิตรเขย่า 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร AAM (Toriyama และ Hinata 1985) ที่เติมอะซิโตไซริงโกน (acetosyringone) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ได้จากการทดลองที่ 3.5.4 แช่ในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำแคลลัสวางบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองเพื่อซับเชื้อส่วนเกินออก เตรียมจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองพร้อมอาหารสูตรชักนำแคลลัส (สูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3.5.4) ที่เติมอะซิโตไซริงโกนความเข้มข้น 100 ไมโครโมล่าร์ โดยใช้อาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงบนการะดาษกรองจากนั้นนำแคลลัสวางลงบนกระดาษกรอง และเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียมโดยใช้ยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม (cefotaxime) ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที ซับน้ำส่วนเกินออกโดยนำแคลลัสมาวางบนกระดาษกรอง พักแคลลัสบนกระดาษกรองเป็นเวลา 7 วัน หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จากการทดลองที่ 3.5.4 ที่เติมยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงโดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงและในที่มืด 8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ ตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวเลี้ยงสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จากการทดลองที่ 3.5.4 ที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงและทำการบันทึกผล

3.5.4.2 ตรวจสอบข้าวที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reation : PCR

สกัดดีเอ็นเอจากข้าวได้ ตามวิธีการ ดังนี้ ตัดชิ้นส่วนใบของข้าวในสภาพปลอดเชื้อให้มีน้ำหนักประมาณ 50-100 มิลลิกรัม (ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร) บดชิ้นส่วนใบให้ละเอียด ทำการเติมสารสกัดดีเอ็นและสารผสม phenol/chloroform/isoamyle อย่างละ 450 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนมาใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม เอทธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 900 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 1 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เทสารละลายส่วนใส ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ในสารละลาย TE buffer 50 ไมโครลิตร ทำลาย RNA โดยการเติมเอ็นไซม์ RNase 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าว 1 ไมโครลิตรเติม 10x Taq buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10 mMdNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ที่มีความจำเพาะกับโปรโมเตอร์ CaMV35S คือ ไพรเมอร์ส่วนฟอร์เวิร์ด TGCGAAGGATAGTGGGATTGTGC และไพรเมอร์ส่วนรีเวิร์ส GGATTGATGTGAACATGGTGGAG สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ 35S ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร 3 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Tag DNA polymerase ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องพีซีอาร์ (EPPENDORF รุ่น MASTER CYCLER EP GRADIENTS) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Predenaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที	
	3 step cycling	
Denaturation	ที่ 95 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาที	35 รอบ
Annealing	ที่ 62 องศาเซลเซียสนาน 1นาที	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1นาที	
Final extension	ที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที	

ตรวจสอบผลพีซีอาร์ ที่ได้โดยทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสความเข้มข้น 1.0% ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

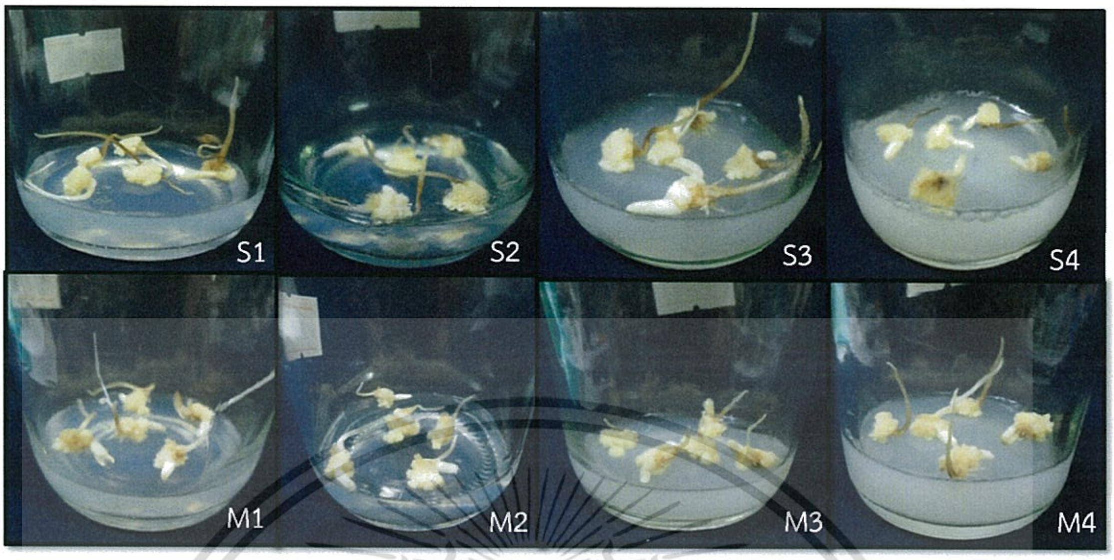
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งต่อการพัฒนาให้เกิดต้นใหม่

เมล็ดข้าว กข6 และ กข15 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส S1-S2 และ M1-M4 ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนตินที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 4.1 และ 4.2) พบว่าลักษณะสีของแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 8 สูตร แคลลัส ของข้าวกข6 และกข15 ในสูตรอาหาร S2 และ M2 ให้แคลลัสมีลักษณะที่ดี มีสีขาวครีม แตกต่างจากแคลลัสในสูตรอาหาร S1 และ M1 ให้ลักษณะสีของแคลลัสเป็นสีเหลืองครีม และมีบางส่วนของแคลลัสเป็นสีน้ำตาลบริเวณใกล้ๆกับส่วนที่ติดกับอาหาร สูตรอาหารที่มีการเติมแป้งเป็นส่วนประกอบ S3 และ M3 และ S4 และ M4 แคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นสีเหลืองเข้ม ส่วนของแคลลัสที่ติดกับอาหารจะมีสีน้ำตาลเข้มทำให้อาหารตรงบริเวณนั้นเกิดสีน้ำตาลจากสารฟีนอลิคที่แคลลัสผลิตออกมา

แคลลัสของข้าว กข6 และ กข15 อายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการทดลองที่ 3.5.2 มาพักไว้ในกระดาษกรองเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด ทำการย้ายแคลลัสลงในอาหารชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่ 2 สูตรที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลมอลโตส) พบว่าที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์แคลลัสเริ่มมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น จากนั้นทำการเลี้ยงต่อจนครบกำหนดระยะเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตเห็นว่า ในสัปดาห์ที่ 3 แคลลัสเริ่มมีการเจริญเติบโตเกิดเป็นยอดอ่อน และเมื่อครบ 4 สัปดาห์ จะเห็นยอดพัฒนาขึ้นชัดเจนดังรูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่ได้จากอาหารทั้ง 8 สูตร ให้ประสิทธิภาพการเกิดจุดเขียวแตกต่างกันน้อยมาก แต่ในอาหารนี้กลับให้การเจริญเป็นต้นใหม่ที่แตกต่างกันในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

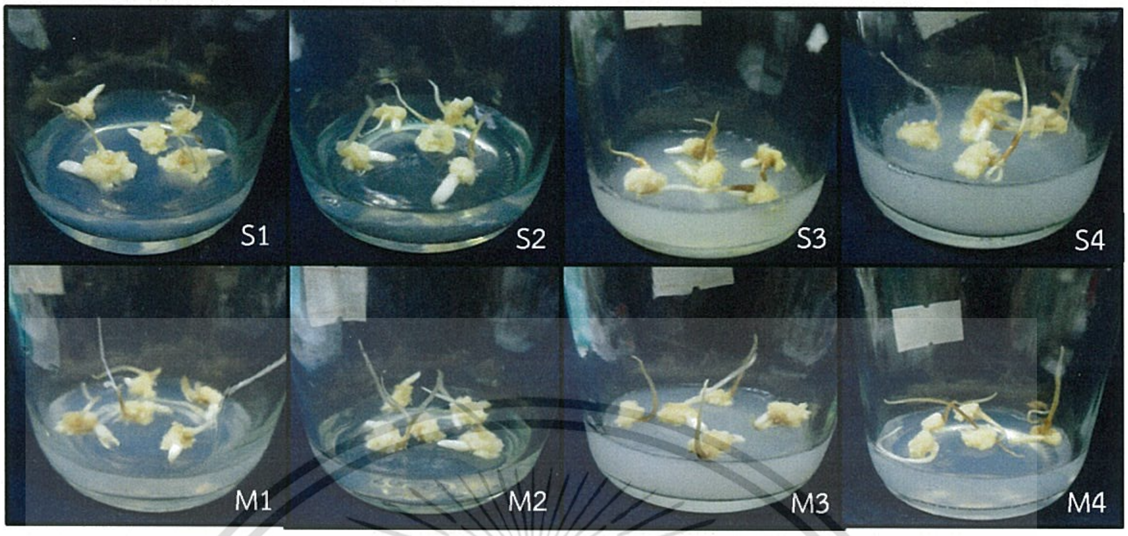


รูปที่ 4.1 ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ กข6 จากการชักนำในอาหารทั้ง 8 สูตร ที่มีสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งและชนิดน้ำตาลต่างกัน S = น้ำตาลซูโครส M = น้ำตาลมอลโตส 1. อาหารที่มีวุ้น 8 กรัมต่อลิตร 2. อาหารที่มีวุ้น 2 กรัมต่อลิตร phytagel 4 กรัมต่อลิตร 3. อาหารที่มีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร 4. อาหารที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร

แคลลัสข้าว กข6 นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (RS) เป็นส่วนประกอบ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นต่ำ ประสิทธิภาพในการเกิดเป็นต้นใหม่และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสสูงสุดในอาหารสูตร M4 คิดเป็น 41.67 เปอร์เซ็นต์ และให้ยอด 2.61 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 4.1) เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นที่ได้จากแคลลัสในอาหารสูตร S1 S2 S3 S4 และM2 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่ 30.81 31.25 31.25 31.25 และ 30.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แคลลัสที่ผ่านการชักนำให้เกิดต้นบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสให้ประสิทธิภาพการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อนำแคลลัส กข6 จากวิธีการทดลองต่างๆ มาชักนำให้เกิดต้นใหมในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร (RM) ให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นที่สูงกว่าอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ใช้น้ำตาลซูโครสในระดับความเข้มข้นเท่ากัน แคลลัสจากอาหารสูตร M2 ให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุดคิดเป็น 68.75 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทาสถิติกับวิธีการทดลองอื่นๆ เมื่อเทียบกับแคลลัสจากอาหารสูตรอื่นที่เลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ชนิดเดียวกัน

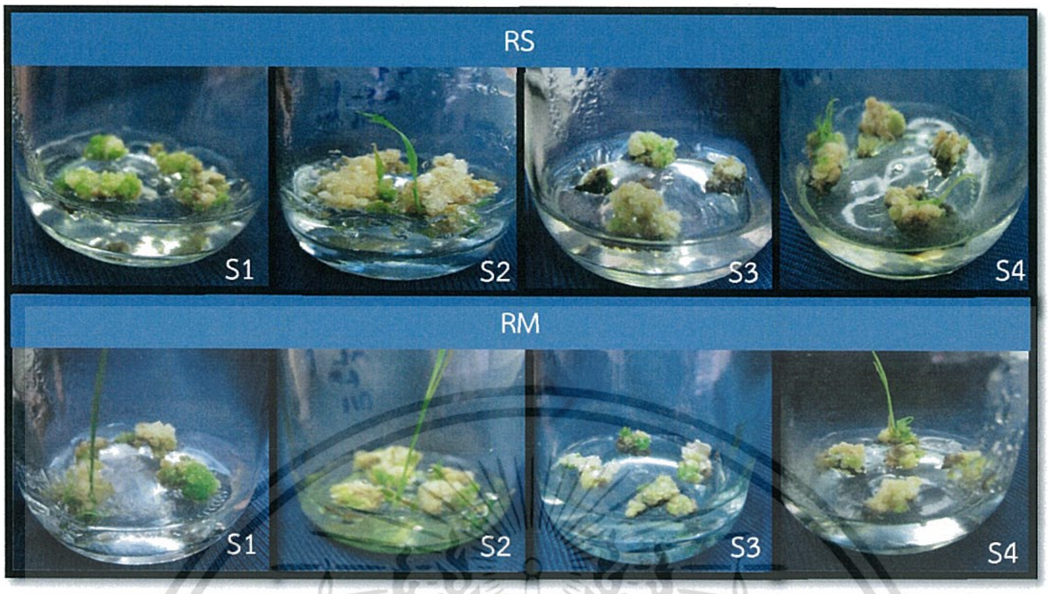
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



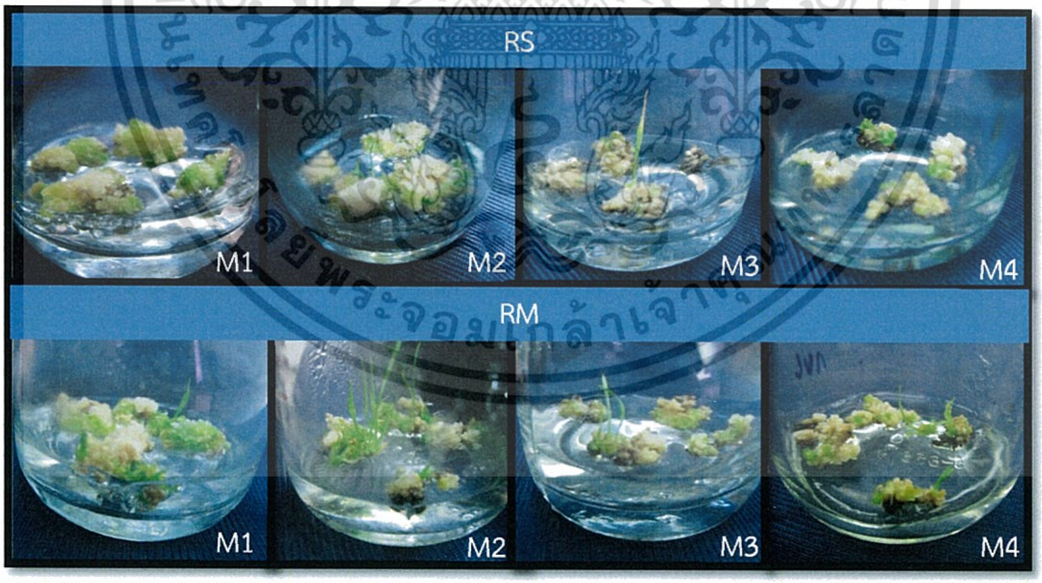
รูปที่ 4.2 ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ กข15 จากการชักนำในอาหารทั้ง 8 สูตร ที่มีสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งและชนิดน้ำตาลต่างกัน S = น้ำตาลซูโครส M = น้ำตาลมอลโตส 1. อาหารที่มีวุ้น 8 กรัมต่อลิตร 2. อาหารที่มีวุ้น 2 กรัมต่อลิตร phytagel 4 กรัมต่อลิตร 3. อาหารที่มีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้ง 10 กรัมต่อลิตร 4. อาหารที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวเจ้า 10 กรัมต่อลิตร

รองลงมาคือแคลลัสจากอาหารสูตร S1 และ S2 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น 54.17 และ 51.39 ตามลำดับ แคลลัสจากอาหาร S1 และ S2 ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาต้นใหม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RM (ตารางที่ 4.2) แคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร S3 S4 และM3 ให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นในระดับต่ำ (43.06 41.67 และ41.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) แคลลัสข้าว กข6 ที่ชักนำได้จากอาหารทุกสูตร ให้จำนวนยอดต่อแคลลัส ในอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่มีน้ำตาลซูโครสและมอลโตสไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.1และ 4.2) แต่การใช้น้ำตาลมอลโตสในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสและสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง คือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ phytagel 4 กรัมต่อลิตร และการชักนำให้เกิดต้นมีแนวโน้มให้ยอดที่ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (S1-S4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS : แถวบน) หรือ มอลโตส (RM : แถวล่าง)



รูปที่ 4.4 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสข้าวสายพันธุ์ กข6 ที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (M1-M4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS : แถวบน) หรือ มอลโตส (RM : แถวล่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของของข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS)

สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
S1	23.00	23.00	100.00	7.17	30.81±2.8[a]	13.33	1.74±0.59[a]
S2	24.00	24.00	100.00	7.50	31.25±2.0[a]	13.33	2.39±0.57[a]
S3	24.00	22.00	91.67	7.50	31.25±6.2[a]	13.33	2.10±0..23[a]
S4	24.00	21.00	90.20	7.50	31.25±10.4[a]	10.00	1.71±0.67[a]
M1	24.00	20.33	91.67	8.00	33.33±8.3[a]	10.33	1.56±0.51[a]
M2	24.00	22.00	91.67	7.36	30.69±2.3[a]	13.00	1.76±0.16[a]
M3	24.00	20.00	83.33	8.67	36.11±16.8[a]	17.00	1.98±0.34[a]
M4	24.00	22.00	91.6	10.00	41.67±8.0[a]	22.33	2.61±0.85[a]

1/ S1-S4 = อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส และ M1-M4 = อาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.2

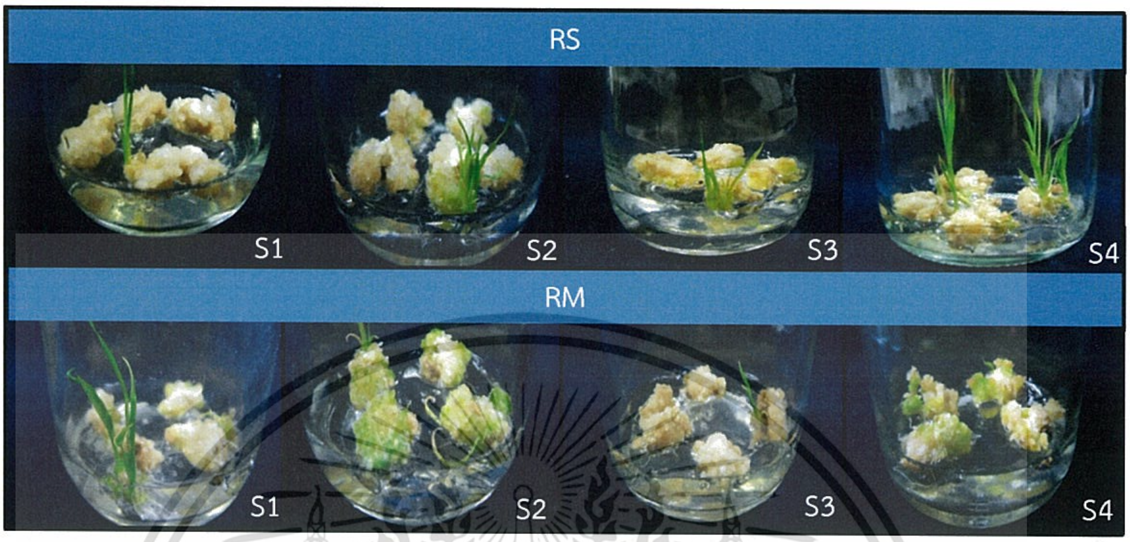
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข6 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลมอลโตส (RM)

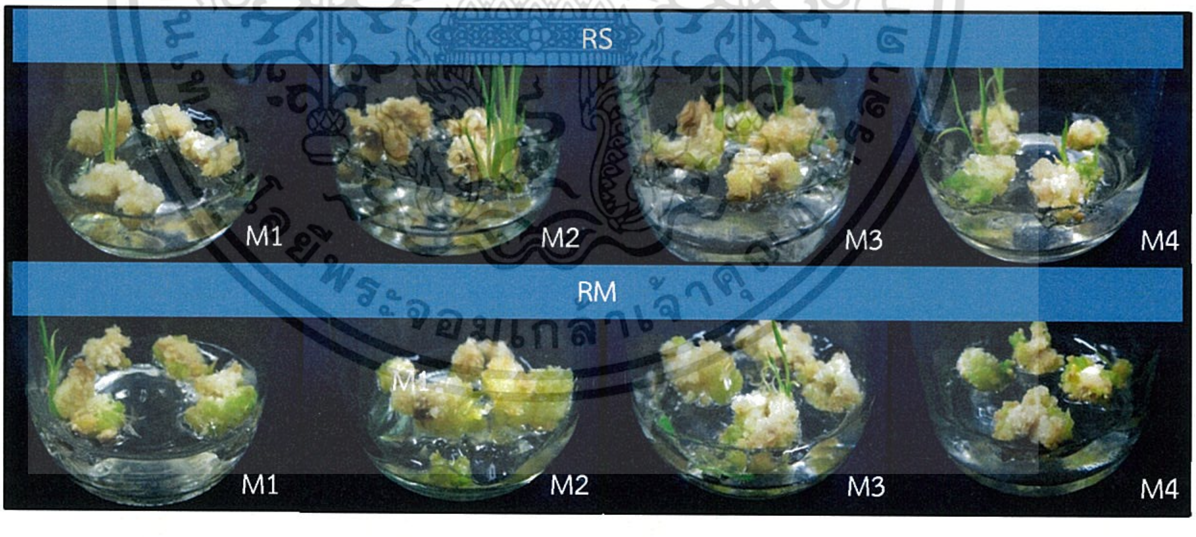
สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
S1	24.00	23.00	95.83	13.00	54.17±4.16[b]	21.33	1.88±0.74[a]
S2	24.00	21.67	90.28	12.33	51.39±24.33[bc]	27.33	2.68±0.70[a]
S3	24.00	22.67	94.44	10.33	43.06±12.02[bcd]	23.67	2.17±1.22[a]
S4	22.67	21.33	94.44	9.33	41.67±11.02[bcd]	15.67	1.82±0.37[a]
M1	24.00	22.33	93.05	8.33	34.72±4.81[d]	16.33	2.07±0.53[a]
M2	24.00	23.00	95.83	16.5	68.75±2.08[a]	31.00	2.09±0.84[a]
M3	24.00	22.00	91.67	10.00	41.67±4.16[bcd]	20.33	2.07±0.57[a]
M4	24.00	23..33	97.92	9.50	38.89±2.43[cd]	20.67	2.25±1.00[a]

1/ S1-S4 = อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส และ M1-M4 = อาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสข้าวสายพันธุ์ กข15 ที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (S1-S4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS : แถวบน) หรือ มอลโตส (RM : แถวล่าง)



รูปที่ 4.6 จุดเขียวและต้นที่ได้จากการนำแคลลัสข้าวสายพันธุ์ กข15 ที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน (M1-M4) ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS : แถวบน) หรือ มอลโตส (RM : แถวล่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการชักนำให้เกิดต้นของแคลลัสข้าวสายพันธุ์ กข15 ในน้ำตาลซูโครสและมอลโตส ในสัปดาห์ที่ 2 แคลลัสให้การเกิดจุดเขียวในปริมาณสูง (ตารางที่ 4.3 และ 4.4) แคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร M3 ที่ใช้น้ำตาลซูโครส (30กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงสุด 74.72 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ได้จากแคลลัสในอาหารสูตรอื่น รองลงมาคือแคลลัสจากสูตร S2 และ S4 ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 63.89 และ 63.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) แคลลัสจากอาหารสูตร S2 ให้จำนวนยอดต่อแคลลัสสูงสุดที่ 3.14 ยอด การชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตส (30 กรัมต่อลิตร) เป็นส่วนประกอบ แคลลัสของข้าวสายพันธุ์ กข15 จากอาหารสูตร S4 ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงสุด 54.17 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร M3 และ M4 ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้น 50 และ 46.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

แคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร S2 และ M2 ที่มี วุ้น 2 กรัมต่อลิตรและ phytagel 4 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มให้การพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ดี ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้แคลลัสที่ได้จากอาหารที่มีการเติมแป้งเป็นส่วนประกอบ ในอาหารสูตร S3 S4 และM3 มีแนวโน้มให้การพัฒนาเป็นต้นที่สูง (ตารางที่ 4.3) แคลลัสจากข้าวสายพันธุ์ กข15 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (30 กรัมต่อลิตร) เป็นส่วนประกอบ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่สูงกว่าการชักนำให้เกิดต้นในน้ำตาลมอลโตส (30 กรัมต่อลิตร)

การใช้น้ำตาลมอลโตสช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส (Park และคณะ 2013 : Zaidi และคณะ 2006) เนื่องจากน้ำตาลมอลโตสมีส่วนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (R.K. Jain และคณะ 1997 : Bidhan Roy และ Mandal 2005) ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดยอดที่สูงขึ้น ในข้าวสายพันธ์อินดิกาการใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ประสิทธิภาพในการพัฒนายอดที่ดีกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์จาโปนิกาแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมคือน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้น้ำตาลมอลโตสยังส่งผลต่อแรงดันออสโมติกของพืชเช่นเดียวกับการเติมสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง (Jain และคณะ 1997) อาจเป็นไปได้ว่าแรงดันออสโมติกของอาหารอยู่ในระดับที่เหมาะสม จึงส่งผลต่อการดูดซึมธาตุอาหารไปใช้ของพืชทำให้พืชเกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ดี (Kiebert และVan Der Plas 1985: Amador และ Stewart 1987) การเติม วุ้น phytagel™ และแป้งลงไปในอาหาร ช่วยส่งเสริมให้เกิดการเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีขึ้น ยังช่วยเพิ่มจำนวนยอดต่อแคลลัสให้สูงขึ้น รวมถึงการเกิดรากที่เพิ่มขึ้น (Lentini และคณะ 1995 : ALI และคณะ 2004)

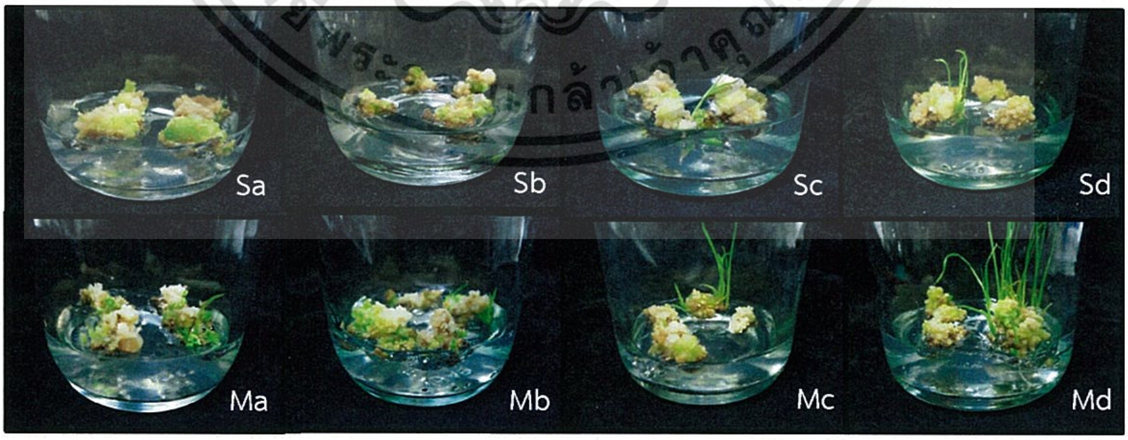
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของความเข้มข้นของแป้งในอาหารชักนำแคลลัสที่มีผลต่อการพัฒนาให้เกิดเป็นต้นใหม่

แคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ กข6 และ กข15 ที่พัฒนาจากอาหารสูตร M2 ที่มีการเติม วุ้น 2 กรัมต่อลิตร และ phytagel 4 กรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นใหม่สูงที่สุดในอาหารชักนำให้เกิดต้น ในขณะที่แคลลัสของข้าวที่เจริญจากอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบมีแนวโน้มการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมในอาหารชักนำแคลลัสที่เติมวุ้น 2 กรัมต่อลิตร และ phytagel 4 กรัมต่อลิตร และศึกษาผลการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของพืช

4.2.1 ข้าวสายพันธุ์ กข6

แคลลัสพัฒนามาจากการเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งแตกต่างกันในที่มืดระยะเวลา 4 สัปดาห์ นำแคลลัสดังกล่าวมาพักบนกระดาษกรองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการย้ายแคลลัสลงในอาหารชักนำให้เกิดต้น จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของแป้งในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มในการชักนำให้แคลลัสเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี แคลลัสจากอาหารสูตร Md (แป้ง 10 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้น 66.87 เปอร์เซ็นต์ และให้ยอดต่อแคลลัสอยู่ที่ 2.58 ยอด สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่ให้ประสิทธิภาพในการเกิดต้นสูงอันดับสอง คือ แคลลัสจากอาหารสูตร Mc (แป้ง 5 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพในการเกิดต้น 58.34 เปอร์เซ็นต์ และให้ยอด 1.99 ยอด (ตารางที่ 4.5) ความเข้มข้นของแป้งที่เพิ่มขึ้นในช่วงของการชักนำแคลลัส มีผลต่อการพัฒนาและการยืดยาวของต้นข้าว เมื่อเทียบกับแคลลัสในอาหารที่ไม่มีการเติมแป้ง (อาหารสูตร Sa และ Ma) ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ กข6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส (Sa-Sd) หรือ น้ำตาลมอลโตส (Ma-Md) ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของของข้าวพันธุ์ กข15 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลซูโครส (RS)

สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส 1/	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
S1	24.00	24.00	100	12.33	51.39 ± 4.81^{b}	25.33	2.37 ± 0.78^{a}
S2	24.00	24.00	100	15.33	63.89 ± 17.34^{ab}	47.67	3.14 ± 0.33^{a}
S3	20.00	20.00	100	10.33	54.17 ± 12.50^{b}	22.33	2.23 ± 0.54^{a}
S4	22.67	22.67	100	14.43	63.75 ± 1.25^{ab}	30.00	2.10 ± 0.89^{a}
M1	24.00	24.00	100	13.67	56.94 ± 15.78^{ab}	25.67	2.24 ± 0.58^{a}
M2	24.00	24.00	100	15.00	62.50 ± 7.20^{ab}	34.67	2.32 ± 0.36^{a}
M3	20.00	20.00	100	15.13	74.72 ± 4.59^{a}	35.33	2.49 ± 0.70^{a}
M4	24.00	24.00	100	11.67	48.61 ± 8.67^{b}	34.00	2.98 ± 0.72^{a}

1/ S1-S4 = อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส และ M1-M4 = อาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มีน้ำตาลมอลโตส (RM)

สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
S1	24.00	23.67	98.61	9.50	39.58±6.25[a]	17.67	1.92±1.20[a]
S2	20.00	20.00	100	8.67	43.06±14.63[a]	23.00	2.83±0.55[a]
S3	24.00	24.00	100	9.33	38.89±12.73[a]	21.33	2.30±0.54[a]
S4	16.00	16.00	100	7.67	54.17±23.20[a]	19.00	2.57±1.38[a]
M1	16.00	16.00	100	8.00	54.17±16.63[a]	11.67	2.03±1.06[a]
M2	24.00	24.00	100	9.33	38.89±10.48[a]	20.67	2.22±0.60[a]
M3	22.67	22.67	100	11.00	50.00±21.65[a]	28.00	2.65±0.51[a]
M4	21.33	21.33	100	9.67	46.53±15.07[a]	23.00	2.40±0.14[a]

1/ S1-S4 = อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส และ M1-M4 = อาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข6 ชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส

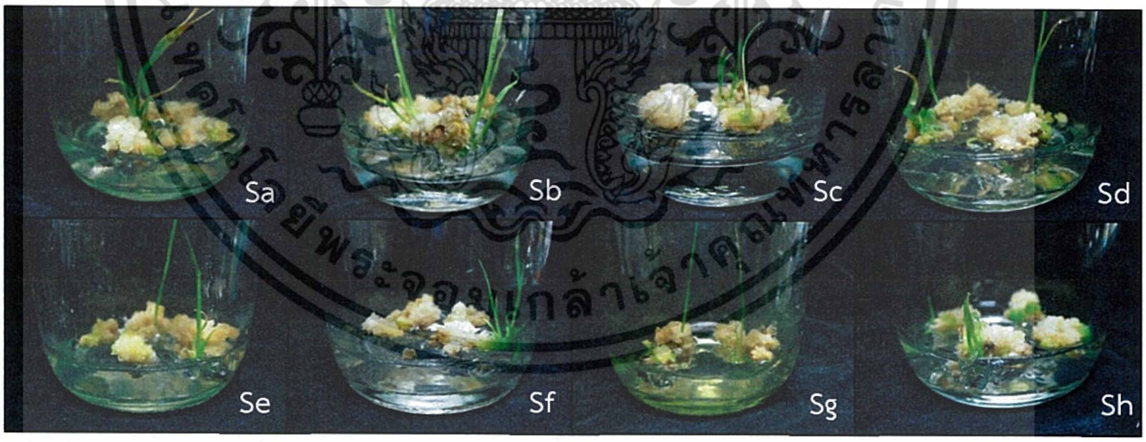
สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
Sa	30.67	30.00	97.92	11.83	38.91±8.50[c]	15.33	1.25±0.37[c]
Sb	30.67	30.33	98.81	10.50	34.38±8.27[bc]	19.00	1.80±0.00[ab]
Sc	29.33	29.33	100.00	12.73	43.68±11.24[bc]	23.67	1.85±0.46[b]
Sd	32.00	32.00	100.00	15.00	46.87±10.83[bc]	35.33	2.40±0.45[ab]
Ma	29.33	29.33	100.00	14.33	55.21±6.51[ab]	28.00	2.00±0.47[ab]
Mb	32.00	32.00	100.00	17.33	54.17±10.97[ab]	38.33	2.26±0.37[ab]
Mc	32.00	32.00	100.00	18.67	58.34±11.83[ab]	33.67	1.99±0.24[ab]
Md	29.33	29.33	100.00	18.50	66.87±13.01[a]	48.67	2.58±0.45[a]

1/ Sa-Sd = อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส และ Ma-Md = อาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

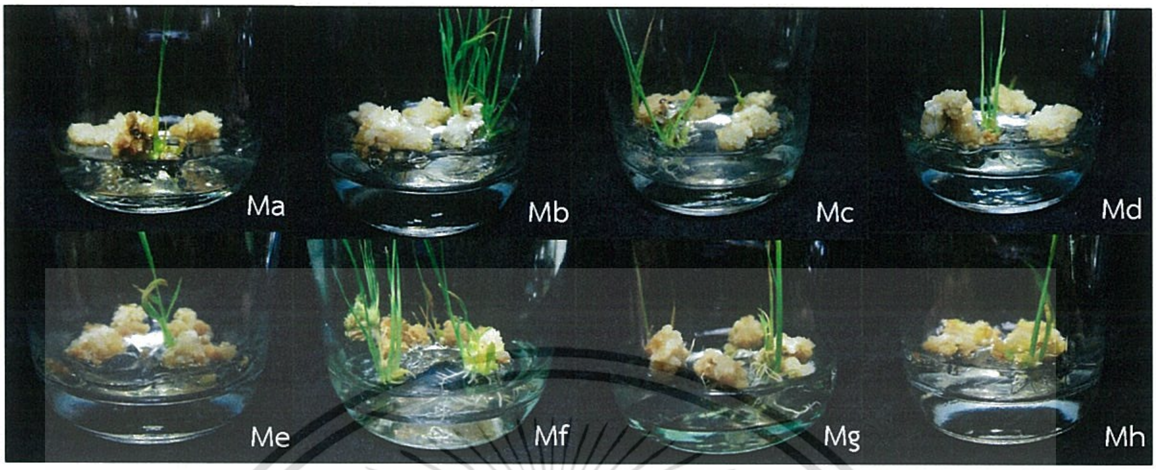
4.2.2 ข้าวสายพันธุ์ กข15

แคลลัสพัฒนามาจากเมล็ดข้าวที่เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารที่ให้ประสิทธิภาพในการเจริญเป็นต้นใหม่ที่ดีที่สุดจากการทดลองตอนที่ 3.5.2 ของข้าวสายพันธุ์ กข15 ย้ายแคลลัสพักบนกระดาษกรอง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสลงอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (น้ำตาลซูโครส 20 และ 30 กรัมต่อลิตร และ น้ำตาลมอลโตส 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) ผลปรากฏว่า แคลลัสจากอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลมอลโตสช่วงของการชักนำให้เกิดแคลลลัส ให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงกว่า เมื่อเทียบกับแคลลัสในอาหารสูตรที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ประสิทธิภาพในการพัฒนาแคลลัสเป็นต้นสูงสุดได้รับจากอาหารสูตร Mf (และแป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูง 84.33 เปอร์เซ็นต์ ให้ยอดต่อแคลลัส 2.83 ยอด ตารางที่ 4.7 แคลลัสที่ให้ประสิทธิภาพในการเกิดต้นสูงอันดับสอง คือ แคลลัสจากอาหารสูตร Me (มอลโตส 30 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้น 81.43 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดต่อแคลลัส 3.18 ยอด ในการเติมแป้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 2.5 5 และ10 กรัมต่อลิตร) ในช่วงของการพัฒนาเกิดแคลลัส ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี เมื่อเทียบกับแคลลัสจากสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมแป้ง (รูปที่ 4.8 4.9)



รูปที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ กข15 ที่เติมน้ำตาลซูโครส (Sa-Sh) ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ผลของความเข้มข้นของแป้งที่แตกต่างกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ กข15 ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (Ma-Mh) ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่บนอาหารสูตร RS

แคลลัสข้าวพันธุ์ กข6 และ กข15 ที่ได้จากอาหารสูตรที่เติมแป้งให้ลักษณะต้นที่ดี สอดคล้องกับการทดลองของ Henderson และ Kinnersley (1988) ในการใช้แป้งเป็นส่วนประกอบในอาหาร ทำให้อาหารมีลักษณะเป็นกึ่งแข็ง (Zimmerman และคณะ 1995 : Malliro และ Lameck 2004) การเติมแป้งลงไปในอาหารมีความเป็นไปได้ที่พืชสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรอง เพราะในแป้งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก และยังมีความสามารถในการเป็นตัวช่วยให้เกิดการพัฒนาของพืช ทำให้พืชพัฒนาไปเป็นยอดและให้จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น (Huang และ Liu 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส

สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
Sa	25.33	25.33	100.00	14.00	54.29 ± 14.86^{a}	32.67	2.41 ± 0.72^{a}
Sb	25.33	24.67	97.62	11.33	46.19 ± 16.05^{a}	34.33	3.03 ± 0.05^{a}
Sc	25.33	25.00	98.81	15.67	62.62 ± 14.04^{a}	42.33	2.58 ± 0.75^{a}
Sd	25.33	25.33	100.00	12.00	49.52 ± 17.73^{a}	30.33	$2.49\pm.041^{a}$
Se	25.33	24.33	95.48	14.00	55.24 ± 1.80^{a}	30.33	2.14 ± 0.1^{a}
Sf	24.00	24.00	100.00	14.00	57.50 ± 18.87^{a}	34.33	2.38 ± 0.33^{a}
Sg	25.33	25.33	100.00	15.00	58.81 ± 7.87^{a}	35.67	2.31 ± 0.52^{a}
Sh	25.33	25.00	98.33	11.00	43.10 ± 9.32^{a}	34.33	3.20 ± 1.14^{a}

1/ Sa-Sh = อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นของแป้งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ กข15 ชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส

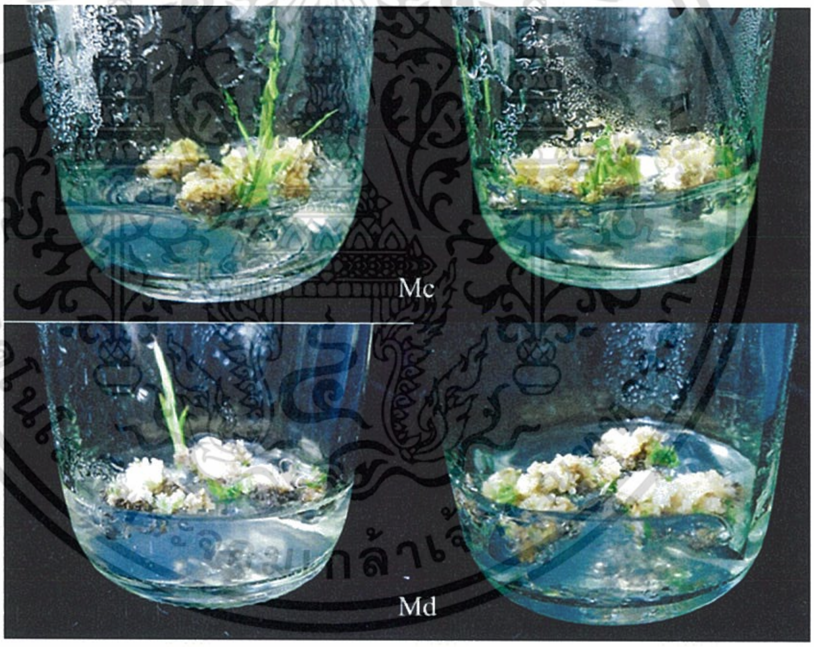
สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส[1/]	จ.น.แคลลัสทั้งหมด	จ.น.แคลลัสที่เกิดจุดเขียว	เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว	จ.น.แคลลัสเกิดต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น	จำนวนต้น	จ.น.ยอดต่อแคลลัส
Ma	26.67	26.00	97.62	20.67	77.38 ± 7.43^{ab}	78.00	3.59 ± 1.89^{a}
Mb	26.67	26.67	100	21.33	79.76 ± 5.45^{ab}	83.33	3.83 ± 0.82^{a}
Mc	24.00	23.33	96.94	18.00	74.72 ± 4.59^{ab}	56.00	3.04 ± 0.59^{a}
Md	25.33	25.33	100	18.00	71.23 ± 6.89^{ab}	58.00	3.20 ± 0.39^{a}
Me	25.33	2533	100	20.67	81.43 ± 3.77^{ab}	67.33	3.18 ± 0.69^{a}
Mf	22.67	22.33	97.92	19.00	84.33 ± 2.81^{a}	57.33	2.83 ± 1.20^{a}
Mg	24.00	24.00	100	16.00	67.86 ± 15.45^{b}	61.00	3.88 ± 0.46^{a}
Mh	22.67	22.00	97.42	16.67	75.40 ± 10.58^{ab}	44.00	2.55 ± 0.91^{a}

1/ Ma-Mh = อาหารที่มีน้ำตาลมอลโตส โดยองค์ประกอบของอาหารตามการทดลองที่ 3.5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

แคลลัสที่ได้รับจากอาหารสูตร Mc และ Md จากการทดลองที่ 4.2.1 ให้ประสิทธิภาพในการเกิดต้นใหม่ของข้าว กข6 ไม่แตกต่างกัน จึงได้นำอาหารทั้ง 2 สูตร มาทำการทดลองการถ่ายโอนยีน ผลปรากฏว่า ในสูตรอาหารที่เติมแป้ง 10 กรัมต่อลิตร (Md) ให้ประสิทธิภาพในการเกิดต้นที่ 66.67 เปอร์เซ็นต์ และให้ยอดต่อแคลลัสอยู่ที่ 2.85 ยอด ส่วนในอาหารที่เติมแป้งความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการเกิดต้นที่ 58 เปอร์เซ็นต์และการเกิดยอดต่อแคลลัสอยู่ที่ 1.62 ยอด ลักษณะต้นที่ได้จากอาหาร Mc จะเห็นต้นได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับต้นในสูตรอาหาร (รูปที่4.10) ต้นทั้งหมดของอาหารสูตร Mc (78 ต้น) และอาหารสูตร Md (67ต้น) ถูกย้ายลงในอาหารคัดเลือกเพื่อทำการคัดเลือกต้นที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ทำการคัดเลือกเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.10 ลักษณะต้นที่ได้ภายหลังการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมของข้าวพันธุ์ กข6 หลังในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่เติมน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลปรากฏว่า ต้นที่ไม่ต้านทานยาปฏิชีวนะใบจะมีสีเหลือง จากนั้นใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายลงในที่สุด แต่ยังมีต้นที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้โดยต้นดังกล่าวยังมีสีเขียวให้เห็นอยู่ในวันที่ 10 หลังผ่านการเลี้ยงในยาปฏิชีวนะ ดังรูปที่ 4.11

รูปที่ 4.11 ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ กข6 พัฒนาจากแคลลัสที่ได้จากอาหาร 2 สูตร ที่มีความเข้มข้นแป้งแตกต่างกัน Mc = แป้ง 5 กรัมต่อลิตร Md = แป้ง 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหลังผ่านการคัดเลือกในยาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นย้ายต้นดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเพื่อให้ต้นเจริญเติบโต เมื่อต้นเจริญเติบโตทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าวพันธุ์ กข6 นำมาทำ PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธีการด้วย gel electrophoresis พบว่า ต้นที่ผ่านการคัดเลือกในยาปฏิชีวนะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับชิ้นส่วนยีนที่ทำการตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (positive control) รูปที่ 4.12 สาเหตุที่ไม่พบการแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพืชที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ อาจเป็นผลเนื่องจาก ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกมีระดับต่ำเกินไป และส่งผลให้พืชที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ (Azria และ Bhalla 2007 : Ishizaki และ Kumashiro 2008)

รูปที่ 4.12 ผลการเพิ่มจำนวนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่ข้าว กข6 ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบโดยระบบอะกาโรส อิเล็คโตโฟริซิส M แสดง ดีเอ็นเอมาตรฐาน P= Positive control แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เวคเตอร์ที่ถ่ายโอนยีนเป็นแม่แบบ N = Nagative control แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 1-5 แสดงการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมดีเอ็นเอภายหลังการเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นแม่แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการณ์ทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษาผลของน้ำตาลและสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งต่อการพัฒนาให้เกิดต้นใหม่

จากการศึกษาชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด (น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลมอลโตส) ร่วมกับสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็ง (วุ้น Phytagel^{TM} และแป้ง) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า ในสายพันธุ์ของข้าว กข6 แคลลัสที่พัฒนามาจากอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร M2 ที่เติมน้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารที่ทำให้เป็นอาหารกึ่งแข็งคือ วุ้น 2 กรัมต่อลิตรและ Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร นำแคลลัสไปเลี้ยงให้เกิดต้นใหม่ในอาหารสูตร RM (น้ำตาลมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาสูงสุดที่ 68.75 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ข้าว กข15 ประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงได้จากแคลลัสที่พัฒนามาจากอาหารสูตร M3 (วุ้น 8 กรัมต่อลิตรและ แป้ง 10 กรัมต่อลิตร) และ S2 (วุ้น 2 กรัมต่อลิตร และ Phytagel^{TM} 4 กรัมต่อลิตร) และนำแคลลัสไปเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นใหม่ในอาหารสูตร RS (น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) แคลลัสของข้าว กข6 และ กข15 ที่ได้จากอาหารชักแคลลัสที่มีน้ำตาลมอลโตสเป็นส่วนประกอบ มีแนวโน้มในการให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่ในปริมาณที่สูง

5.2 ผลของความเข้มข้นของแป้งในอาหารชักนำแคลลัสที่มีผลต่อการพัฒนาให้เกิดเป็นต้นใหม่

จากการศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสม (0-10 กรัมต่อลิตร) ในอาหารชักนำแคลลัสที่ส่งผลต่อการพัฒนาให้เกิดต้นใหม่ของข้าวสายพันธุ์ กข6 และ กข15 พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข6 ที่ได้จากอาหารสูตร Mc (แป้ง 5 กรัมต่อลิตร) และ Md (แป้ง 10 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่ 58.34 และ 66.87 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร RM ส่วนแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข15 ที่ได้จากอาหารสูตร Mf (แป้ง 2.5 กรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นต้นสูงที่ 84.33 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร RS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 ผลของอิทธิพลจากการถ่ายโอนยีน

จากผลการทดลองการถ่ายโอนดีเอ็นเอในข้าวสายพันธุ์ กข6 ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 พบว่า แคลลัสจากอาหารสูตร Mc และ Md (แป้ง 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ภายหลังการถ่ายโอนดีเอ็นเอ ได้จำนวนต้นทั้งหมด 76 และ 67 ต้นตามลำดับ จากนั้นนำต้นที่ได้ไปทำการคัดเลือกในอาหาร NB ที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายังมีต้นที่ต้านทานยาปฏิชีวนะจำนวน 5 ต้น จากต้นทั้งหมด คิดเป็น 1.43 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำต้นมาตรวจสอบการถ่ายโอนดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยังไม่สามารถตรวจพบ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถ่ายเข้าสู่ในจีโนมของพืช เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดลอกอยู่ในระดับต่ำ ทำให้ได้ต้นที่ไม่มียีนแทรกสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. **ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช**. โรงพิมพ์สหมิตร ออฟเซท, กรุงเทพฯ. 124 น.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 196 น.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2544. **สรีรวิทยาของพืช**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 237 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่2 กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูรัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา.

ALI S., Qing-zhong X.and Xian-yin Z., 2004, **“Assessment of Various Factors Involved in the Tissue Culture System of Rice.”** Rice Science, 11(5-6): 345-349.

Al-khayri J. M. and Al-Bahrany A.M., 2002, **“Callus growth and proline accumulation in respone to sotbitol and sucrose-induced osmetic stress in rice.”** Biologia Plantarum 4 (4): 609-611.

Amador A. M. and Stewart K. A., 1987, **“Osmotic potential and pH of fluid drilling gels as influenced by moisture loss and incorporation of growth regulators.”** J. Am. Soc. Hortic. Sci, 112, 26-28.

Bidhan R., Mandal A. B., 2005, **“Anther culture response in *indica* rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local.”** African Journal of Biotechnology Vol. 4 (3), pp. 235-240.

Cheetham N. W. H. and Leping T., 1998, **“Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study.”** Carbohydrate Polymers 36 277–284.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cigdem A. O., Mahmood K. K. and Arslan O., 2008, "**A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (Nicotiana tabacum L.).**" Scientia Horticulturae 117, 174–181.

De Klerk-Kiebert Y. M. and Van Der Plas L. H. W., 1985, "**Relationship of respiratory pathways in soybean cell suspensions to growth of the cells at various glucose concentrations.**" Plant Cell Tissue Organ Cult, 4, 225-233.

Gupta D. S., Auge R. M., Denchev PD., Conge BV., 1995, "**Growth proline accumulation and water relations of Nacl-selected and non-selected callus line of Dactylis Glomerata L.**" Environmental and Exponential Botany, Vol. 35, No. 1, pp. 83-92.

Henderson W. E. and Kinnersley A.M., 1988, "**Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture.**" Plant Cell, Tissue and Organ Culture l5: 17-22.

Hiei Y., Ohta S., Komari T.and Kumashiro T., 1994, "**Efficient transformation of rice (Oryza *sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA.**" The Plant Journal 6(2), 271-282.

Hoque Md. E., Mansfield J. W. and Bennett M. H., 2005, "**Agrobacterium-mediated transformation of Indica rice genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficiency.**" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 45–55.

Huang W. L. and Liu L. F., 2002., "Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress." Botanical Bulletin of Academia Sinica, Vol.43, 2002.

Ishizaki T. and Kumashiro T., 2008, "**Genetic transformation of NERICA, interspecific hybrid rice between Oryza glaberrima and O. sativa, mediated by Agrobacterium tumefaciens.**" Plant Cell Rep27:319–327.

Jain R. K., Davey M. R., Cocking E. C. and Wu R., 1997, "**Carbohydrate and osmotic requirements for highfrequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of *indica* and *japonica* rice varieties.**" Journal of Experimental Botany, Vol. 48, No. 308, pp. 75.

Khirod K. S., Amit K. T., Ashwani P., Sudhir K. S. and Sneh L. S., 2011, "**An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars.**" Plant Methods 2011, 7: 49.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KUMAR K. K., Maruthasalam S., Loganathan M., Sudhakar D., and Balasubramanian P., 2005, "**An Improved *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Recalcitrant Elite Indica Rice Cultivars.**" Plant Molecular Biology Reporter 23: 67–73.

Kyungsoon L., Hyesung J. and Minkyun K., 2002, "**Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system forhigh-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from *japonica* rice cultivars.**" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 237–244.

Lee K., Jeon H. and Kim M., 2002, "**Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from *japonica* rice cultivars.**" Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 237–244.

Maliro M. F. A. and Lameck G., 2004, "**Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures.**" African Journal of Biotechnology Vol. 3 (4), pp. 244-247.

Masayoshi T., Takayasu H. and Shinobu K., 1996, "**Efficient Plant Regeneration from Cell Suspension Cultures of Rice *(Oryza sativa* L.)**", J Plant PhysioL Vtll. 149. pp. 157-162. MMiles. J., Morris V. J., Orford P. D. and, Ring S. G.. 1985, "**The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch.**" Carbohydrate Research, 135, 271–279.

Nazim-Ud-Dowla M. A. N., Ahmed N.U. and Hassan L., 2008, "**Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation in *indica* Rice.**" Thai Journal of Agricultural Science 41(3-4): 127-133.

Park. S. G., Ubaidillah. M. and Kim K., 2013, "**Effect of Maltose Concentration on Plant Regeneratio of Anther Culture with Different Genotypes in Rice (*Oryza sativa* L.) American Journal of plant Sciences, 4, 2265-2270.**

Pipatnukul T., Sumontip B., Piyada T. and Manit K., 2004, "**Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv.RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.**" Songklanakarin J. Sci. Technol, Vol. 26 No. 1 Jan-Feb.

Rownak A., Shen M., Zapata-Arias F. J., 2000, "**Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency.**" Plant Science 153 155–159.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rossi L., Tinland B.., Hohn B., 1998., “**Role of Virulence Proteins of*Agrobacterium* in the Plant.**” The Rhizobiaceae,1998, pp 303-320.

Wani S. H., Sanghera G. S. and Gosal S. S., 2011, “**An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding Indica rice (Oryza sativa L.) variety PAU 201.**” New Biotechnology Volume 28, Number 4 July.

Weina Z., Shusong Z., Hong-Qing L., 2011, “**An efficient regeneration system and Agrobacterium-mediated transformation of Chinese upland rice cultivar Handao297.**” Plant Cell Tiss Organ Cult. 106:475–483.

Zaida L., Patricia R., Martínez C. P., M. R. William. 1995, “**Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver-nitrate.**” Plant Sci, Volume 110, Issue 1110, 127-138.

Zaidi M. A., Narayanan N., Sardana R., Taga I., Postel S., Johns R., McNulty M., Mottiar Y., Mao J., Loit E. and Altosaar I., 2006, “**Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes.**” Agronomy Reserch 4(2), 563-575.

Zimmerman R. H., Bhardwaj S. V. and Fordham I. M., 1995, “**Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops.**” Plant Cell Issue and Organ Culture 43: 207-213.

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://kasetinfo.arda.or.th/rice/rice-histories.html

http://www.quinl.com/international/Thai+Glutinous+Rice+RD6+rice+16811.html

http://www.ricethailand.go.th/brrd/tech/RD6.htm

http://www.kasetloongkim.com/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=1991&view=next

http://kkn-rsc.ricethailand.go.th/rice/pedigree/01/RD15.html

http://uvmgg.wikia.com/wiki/Agrobacterium_tumefaciens

www.ricethailand.go.th

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

อาหารสูตร NB (Li et al., 1993)

Solution	กรัมต่อลิตร
NB stock solution l	
KNO_3	141.50
$(NH_4)SO_4$	23.15
NB stock solution ll	
$CaCl_2.2H_2O$	8.30
NB stock solution lll	
$MgSo_4.7H_2O$	9.25
KH_2PO_4	23.00
NB stock solution lV	
KI	0.75
H_3BO_3	3.00
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$MnSO_4$.7H2O	10.00
$ZnSO_4.7H_2O$	2.00
$Na_2Mo_4.7H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
NB stock solution V	
$FeSO_4.7H_2O$	2.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$Na_2EDTA.2H_2O$	3.78

Solution	กรัมต่อลิตร
NB stock vitamin	
Inosital	4.00
Nicotinic acid	0.04
Pyridoxine HCl	0.04
Thaimine HCl	0.40
Sucrose 30.00	
Maltose 30.00	
Agar	8.00
Rice Starch	
ปรับพีเอชเป็น 5.6-5.8	

อาหารสูตร NB (อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส)

2,4-D	2	มิลลิกรัมต่อลิตร
Kinetin	0.3	มิลลิกรัมต่อลิตร

อาหารสูตร NB (อาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้น)

IAA	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
BA	2	มิลลิกรัมต่อลิตร
Kinetin	2	มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

อาหารสูตร AAM(Toriyama and Hinata, 1985)

Solution	มิลลิกรัมต่อลิตร
AA macronutrients	
$Na_2HPO_4.2H_2O$	169.60
$MgSO_4.7H_2O$	500.00
KCl	150.00
$CaCl_2.2H_2O$	150.00
AA macronutrients	
$MnSO_4.4H_2O$	10.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
H_3BO_3	3.00
$ZnSO_4.7H_2O$	2.00
$CuSO_4.5H_2O$	0.0387
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
KI	0.75
AA iron	
FeSO4.7H2O	28.00
MS vitamin	
Inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thaiamine HCL	0.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Solution	มิลลิกรัมต่อลิตร
AA amino acid	
Glycine	7.50
Arginine	174.00
Glutamine	876.00
Casamino acid	500.00
Sucrose	68500.00
Glucrose	35000.00

ปรับพีเอชเป็น 5.2

สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืช

สารละลายสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 2 เท่า

0.6 M	NaCl
0.1 M	Tris-HCl (pH 7.5)
40 mM	EDTA (pH 8.0)
1%	SDS

สารสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 เท่า

สารละลายสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 2 เท่า

5 M	Urea
10 mM	mercaptoethanal
5% (V/V)	Phenal

ปรับปริมาตรเป็น 2 เท่า

สารละลายผสม Phenal/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

สารละลาย TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, mM EDTA)

RNase A (20 µg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำอิเล็คโตรโฟริซิส

เจลอะกาโรส	10	กรัมต่อลิตร

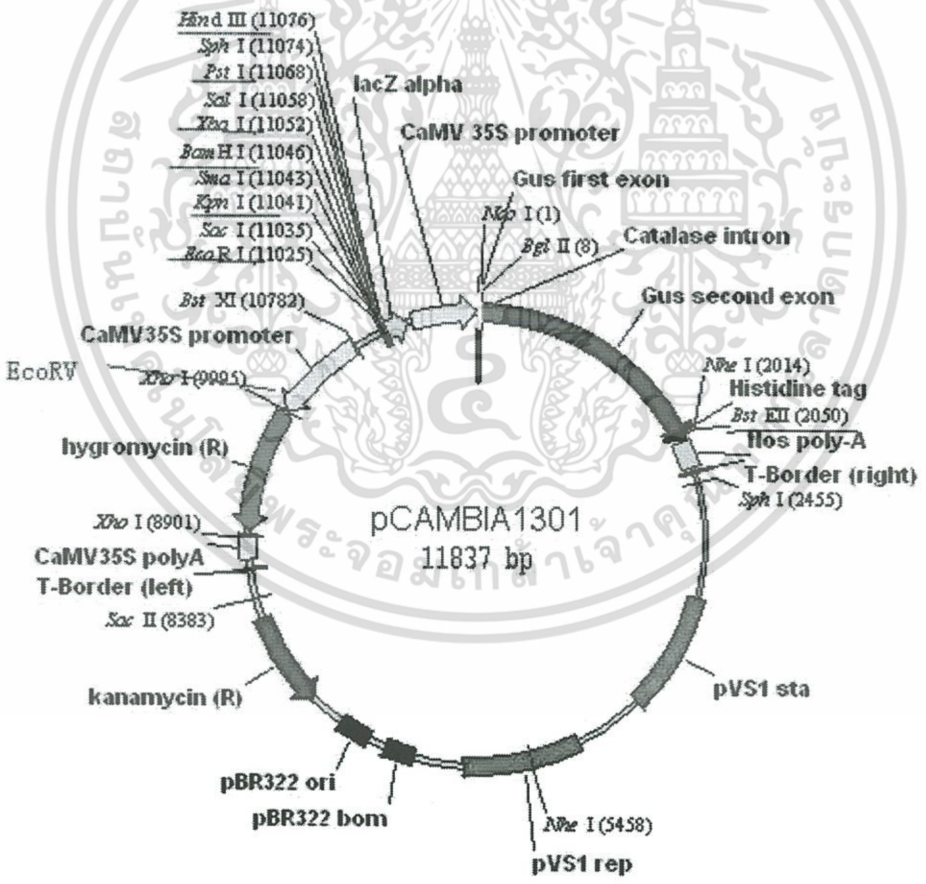
สารละลาย TBE ความเข้มข้น 5 เท่า ประกอบด้วย

Tris	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA	20	มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์สำหรับหยอดดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า ประกอบด้วย

Bromophenol Blue	25	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	25	มิลลิกรัม
Ficoll 400	2.5	กรัม

ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้



เวกเตอร์ pCAMBIA1301 ที่มา(http://emuch.net/html/201411/8114105.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข6 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	310.501	44.357	0.604	0.745
Linear term Contrast	1	181.116	181.116	2.465	0.136
Deviation	6	129.385	21.564	0.293	0.931
	16	1175.840	73.490		
Total	23	1486.341			

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข6 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	2496.98	356.685	8.087	0.00
Linear term Contrast	1	130.286	130.286	2.954	0.105
Deviation	6	2366.512	394.173	8.943	0.00
	16	705.690	44.106		
Total	23	3202.488			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข15 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	1492.034	213.148	1.940	0.129
Linear term Contrast	1	49.965	49.965	0.455	0.510
Deviation	6	1442.069	240.345	2.187	0.99
	16	1758.210	109.88		
Total	23	3250.245			

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข15 ในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	899.186	128.455	0.522	0.805
Linear term Contrast	1	124.107	124.104	0.505	0.488
Deviation	6	755.079	129.180	0.525	0.781
	16	3934.676	245.917		
Total	23	4833.862			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข6 ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีความเข้มข้นของแป้งแตกต่างกัน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	2424.181	346.312	3.236	0.025
Linear term Contrast	1	2236.016	2236.016	20.892	0.000
Deviation	6	188.165	31.361	0.293	0.932
	16	1712.423	107.026		
Total	23	4136.604			

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข15 **ที่ใช้**น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีความเข้มข้นของแป้งแตกต่างกัน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	925.379	132.197	0.706	0.668
Linear term Contrast	1	11.075	11.075	0.059	0.811
Deviation	6	914.305	152.384	0.813	0.575
	16	2997.168	187.323		
Total	23	3922.547			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสข้าว กข15 ที่ใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีความเข้มข้นของแป้งแตกต่างกัน

	Df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups (Combined)	7	649.471	92.782	1.409	0.268
Linear term Contrast	1	25.750	25.750	0.391	0.541
Deviation	6	623.722	103.954	1.579	0.217
	16	1053.383	65.836		
Total	23	1702.854			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายภานุทัต ดาราฉาย

วัน-เดือน-ปีเกิด 11 กรกฎาคม 2529

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน 60/3 ถนน สุขุมวิท 71 ปรีดีพนมยงค์ 14 แขวงพระโขนงเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2551 สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท. บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carbon Sources and Supporting Materials in Callus Induction Effects on Regeneration of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L. cv. RD6 and RD15)

Panutat Darachai[1], Sutee Chutipaijit[1] and Kanokporn Sompornpailin[1, 2*]

[1]College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, THAILAND
[2]Thailand Center of Excellence in Physics, CHE, Ministry of Education, Bangkok, 10400, THAILAND

Abstract

The effect of carbon source and supporting material compositions on callus induction and plant regeneration from mature seeds of two *indica* rice varieties (RD6 and RD15) was studied in the present investigation. NBS1 medium was used for callus induction from the sterilized seeds. And then, three-week-old calli were transferred to four media (NBS1, NBS 2, NBM1 and NBM2) which were different in carbon sources and supporting materials for 3 weeks. Calli of RD6 and RD15 varieties derived from the NBM2 medium (30 g L^{-1} maltose as a carbon source and 2 g L^{-1} agar + 4 g L^{-1} Phytagel^{TM} as a supporting material) showed the higher frequency for green spots and shoot regenerations when compared to the others. Green spot frequency was 91.67% and 83.33% in RD6 and RD15 varieties, respectively. Moreover, calli obtained from the same medium also showed maximum shoot regenerations in RD6 and RD15 varieties (75.00% and 66.67%, respectively). Well-developed plantlets were hardened and transferred to the soil.

Keywords: callus induction, maltose, RD6, RD15, regeneration

1. Introduction

Rice is the most important food crop and a primary food source [1]. Moreover, rice is a model monocot plant for genetically modified plant and functional genomic studies [2]. In Asia, rice consists of two main subspecies, including *indica* (*Oryza sativa ssp. indica*) and *japonica* (*Oryza sativa ssp. japonica*) subspecies. The *indica* subspecies is the most widely cultivated rice in South-East Asia countries [3]. Every year, rice consumers are increasing at the rate of 1.8%, whereas rice production has a fewer increasing rate [4]. The development of plant transformation techniques are a one method which it possible to improve crop plants. However, the transformation systems of *indica* rice remains difficulty and a few studies [5]. Tissue culture has become basic techniques that are used for the rice transformation [6]. Production frequencies of callus and plant regeneration are the primary steps for transformation systems. Callus induction and plant regeneration in rice tissue culture depended on a several factors, such as the genotype, the type and physiological explants, the composition and concentration of the medium, organic components,

*Corresponding author. Tel: +(66)2329-8000 ext. 3139 Fax: +(66)2329-8265
E-mail: kskanokp@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and plant growth regulator in the tissue culture medium [7]. Genotype and explants sources are the main factors in the success of rice regeneration. *Japonica* rice genotypes have been possible to obtain high frequency of plant regeneration, while *indica* rice genotypes have been limiting [8]. Among the various explants, mature seed culture has been identifying suitable explants to produce embryogenic callus under callus induction medium for the maximum callus yield and high plant regeneration [9].

Objectives this study, the efforts have been made to identify and to optimize the physio-chemical substrates in calli that derived from mature seeds of two *indica* rice varieties (RD6 and RD15). Therefore, this study presents a suitable medium for maximum callus induction and high frequency plant regeneration which can be used in genetic transformation and in related works.

2. Materials and Methods

2.1 Callus induction

Mature seeds of two rice varieties RD6 and RD15 (*Oryza sativa* L. cv. RD6 and RD15) were dehusked by hand and sterilized surface by 70% ethanol for 3 min, fallowed by 5% (v/v) commercial bleach (5.25% sodium hypochlorite) for 40 min, and 30% (v/v) commercial bleach for 30 min. And then, the seeds were thoroughly rinsed 4-5 times in sterile-distilled water.

The sterilized seeds were transferred to callus induction medium, the NB medium [10] supplemented with 30 g L^{-1} sucrose, 0.3 mg L^{-1} kinetin, 2 mg L^{-1} 2,4-D and solidified with 8 g L^{-1} agar (NBS1). Mature seeds were cultured *in vitro* under condition of 25±2 °C air temperature in dark condition for 3 weeks. After 3 weeks, the induced calli were transferred to NBS1, NBS2, NBM1 and NBM2 media (Table 1) and then cultured under the same condition for 3 weeks.

2.2 Plant regeneration

Six-week-old calli were desiccated by placed on sterilized Whatman No.1 filter papers and cultured under the same condition for 1 week. And then, calli were transferred to the regeneration medium, the NB medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose, 1 mgL^{-1} IAA, 2 mg L^{-1} BA, 2 mg L^{-1} kinetin and solidified with 5 g L^{-1} Phytagel^{TM}. The calli were cultured at 25±2 °C, 16 h photoperiod and 1000 lux light intensity for 4 weeks.

2.3 Data and statistic analysis

All experiments were designed in Completely Randomized Design (CRD) with five replications.

Table 1. Composition of callus induction medium for RD6 and RD15 varieties

Media	Basal media	Carbon sources	Supporting materials
NBS1	NB medium + 0.3 mg L^{-1} kinetin, 2 mg L^{-1} 2,4-D	30 g L^{-1} sucrose	8 g L^{-1} agar
NBS2	NB medium + 0.3 mg L^{-1} kinetin, 2 mg L^{-1} 2,4-D	30 g L^{-1} sucrose	2 g L^{-1} agar + 4 g L^{-1} Phytagel^{TM}
NBM1	NB medium + 0.3 mg L^{-1} kinetin, 2 mg L^{-1} 2,4-D	30 g L^{-1} maltose	8 g L^{-1} agar
NBM2	NB medium + 0.3 mg L^{-1} kinetin, 2 mg L^{-1} 2,4-D	30 g L^{-1} maltose	2 g L^{-1} agar + 4 g L^{-1} Phytagel^{TM}

3. Results and Discussion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Calli derived from mature seeds cultured in NBS1 medium for 3 weeks were compacting. These calli colors were yellowish or brownish (Figure 1A and B). At 3 weeks, the results of callus induction frequency showed 75 and 82% in seeds of RD6 and RD15 varieties, respectively (Figure 2). Three-week-old calli of both varieties were sub-cultured on 4 different callus induction media in order to test the various compositions of carbon sources (30 gL^{-1} sucrose and maltose) and supporting materials (8 g L^{-1} agar and combination of 2 g L^{-1} agar +4 g L^{-1} Phytagel^{TM}) for 3 weeks. These compositions may have effects on calli characteristics. Embryogenic calli from proper callus induction medium will be suitable for high plant regeneration frequency. Six-week-old calli derived from 4 callus induction media (NBS1, NBS2, NBM1 and NBM2 media) were desiccated in sterilized Whatman No.1 filter papers for 1 week and transferred to regeneration medium. Green spots appeared on calli within 2-3 weeks and developed into shoot buds within 3-4 weeks. These shoot buds were sub-cultured on a NB medium for developing into plantlets (Figure 1C and D).

In 4 weeks of regeneration culture, the percentages of green spots were 77.78, 66.67, 78.57 and 91.67% and the percentages of shoot regenerations were 66.67, 62.5, 57.15 and 75.00% in RD6 calli derived from NBS1, NBS2, NBM1 and NBM2 media, respectively (Figure 3). While the calli of RD15 variety derived from NBS1, NBS2, NBM1 and NBM2 media presented 56.25, 57.14, 38.89 and 83.33% in the percentages of green spots and 43.75, 28.57, 27.78 and 66.67% in the percentages of shoot regenerations, respectively (Figure 4). The results indicated that calli of RD6 and RD15 varieties derived from NBM2 medium containing maltose as carbon source and Phytagel^{TM} combining with agar as supporting medium were exhibited the highest frequency of green spots and shoot regenerations as shown in this study (Figures 3 and 4).

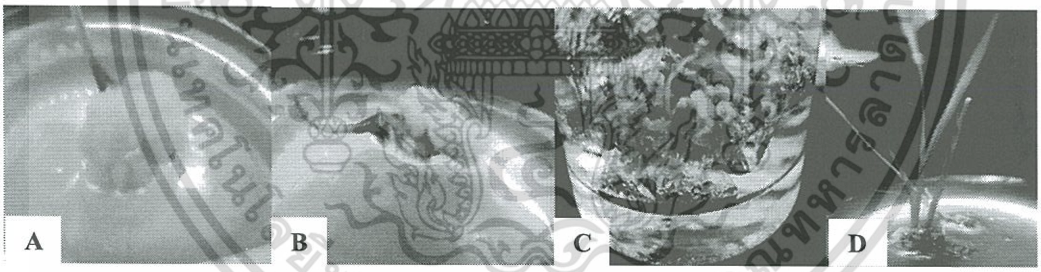


Figure 1. Callus formation of RD6 (A) and RD15 (B) varieties cultured on NBS1 medium under dark conditions. Shoot regenerations from callus of RD15 varieties cultured on regeneration medium under 16 h light conditions (C). Regenerated plants of RD15 varieties cultured on NB medium (D).

Carbon source in the culture medium serves as source of energy for plant growth and development. Our results presented that calli growth in maltose had better development characteristics. Similar to previous reports have been also found maltose to be a better carbon source than sucrose for callus induction and regeneration medium [11]. Media containing sucrose has been reported to promote the ethylene production in plant tissue [12]. Ethylene is a plant growth regulator which can cause the browning of callus in tissue culture. Moreover, maltose has been described as the osmotic regulator agent for callus cellular environment. The culture media using maltose as a carbon source may be protecting the calli from the browning formation and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

osmotic potential [13-15]. Type and concentration of supporting materials in callus induction medium was also important in enhancing the frequencies of callus induction and regeneration [8]. Agar is containing agropectins and some other organic impurities that might have inhibitory effects on the explants growth and callus proliferation. Phytagel™ is to be free of such impurities as have been found in supporting material [16]. Thus media containing maltose as a carbon source with Phytagel™ as a supporting material should enhance the regeneration efficiency. However, *indica* rice is known to have genotypic difference and high variable among varieties.

4. Conclusions

In this experiment, callus induction media with different type of carbon sources and supporting materials were tested for effect on plant regeneration of *indica* rice, RD6 and RD15 varieties. The combined action of 30 g L^{-1} maltose (carbon source) and 2 g L^{-1} agar +4 g L^{-1} Phytagel™ (supporting materials) in callus induction medium led to high efficiency of callus induction and shoot regenerations in RD6 and RD15 varieties. The callus characteristics in callus induction process could affect the improvements of rice regenerations.

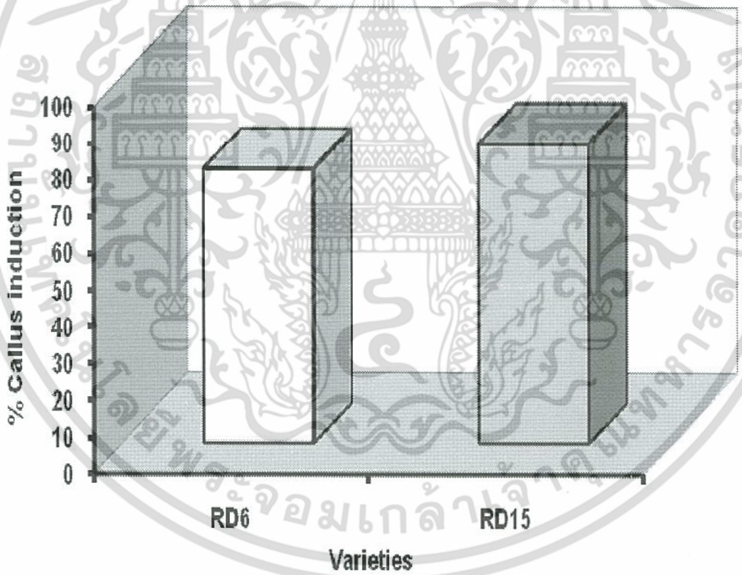


Figure 2. The percentages of callus induction from sterilized seeds were cultured on NBS1 medium in dark condition for 3 weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

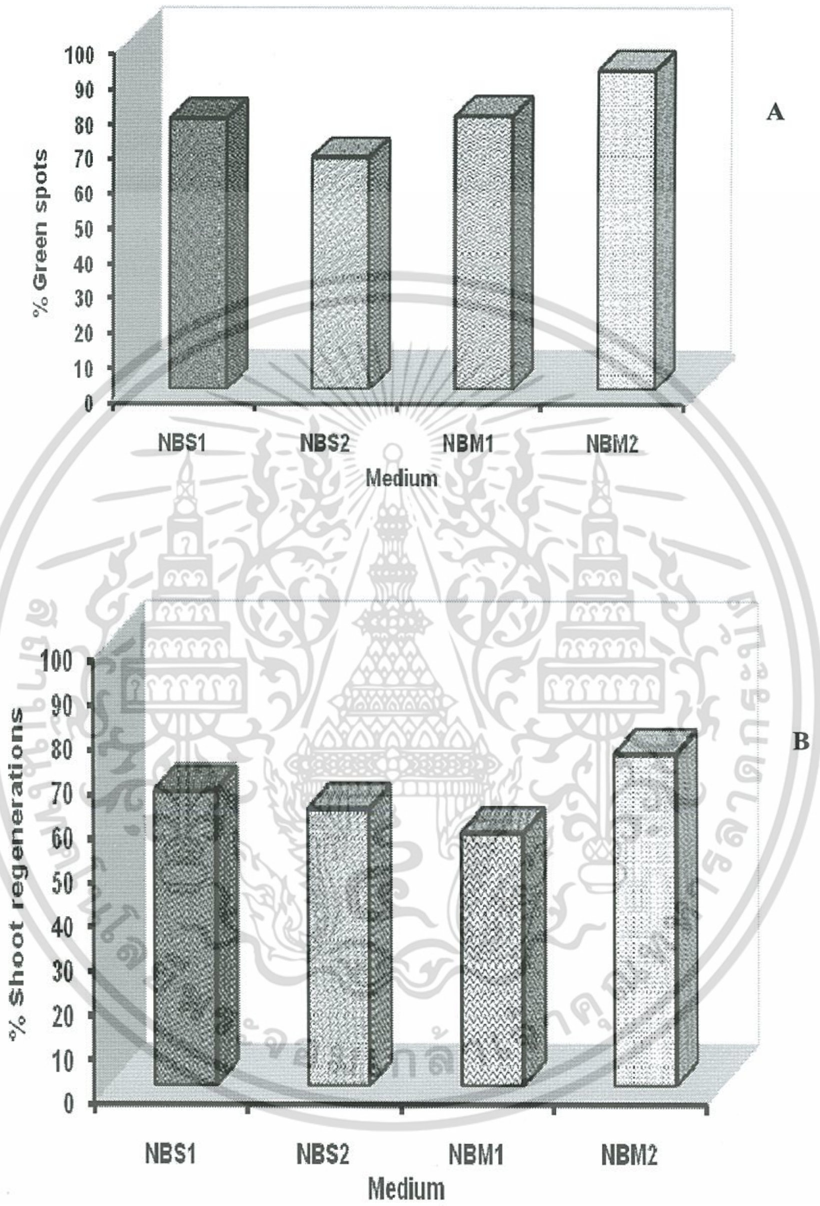


Figure 3. The percentages of green spots (A) and shoot regenerations (B) in RD6 calli derived from NBS1, NBS2, NBM1 and NBM2 media were cultured on regeneration medium for 4 weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

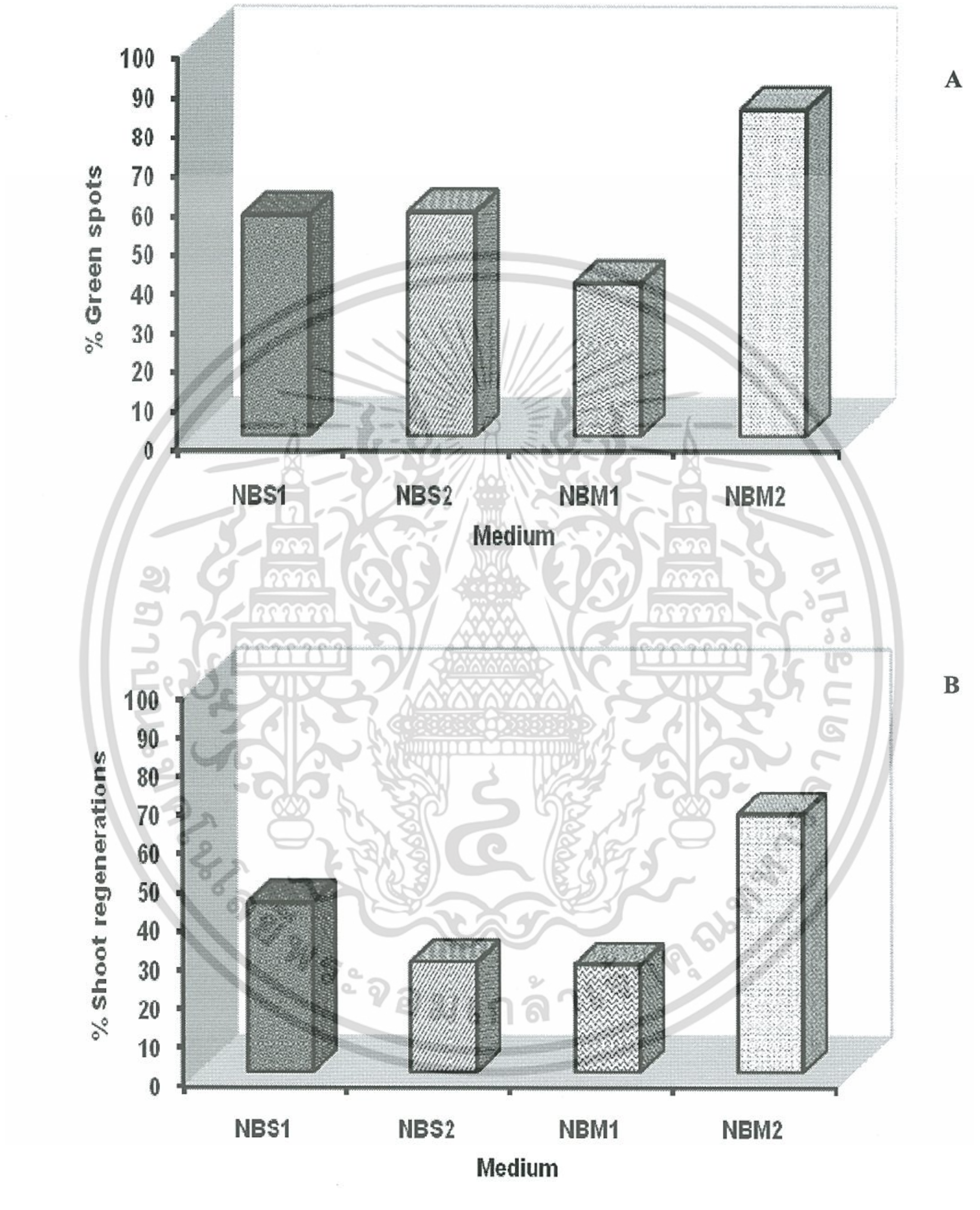


Figure 4. The percentages of green spots (A) and shoot regenerations (B) in RD15 calli derived from NBS1, NBS2, NBM1 and NBM2 media were cultured on regeneration medium for 4 weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

References

[1] Bano, S., Jabeen, M., Rahim, F. and Ilahi, I., **2005**. Callus Induction and Regeneration in Seed Explants of Rice (*Oryza sativa* cv. Swar-II). *Pakistan Journal of Botany,* 37, 829-836.

[2] Tyagi, H., Rajasubramaniam, S. and Dasgupta, I., **2007**. Regeneration and Agrobacterium-Mediated Transformation of a Popular *Indica* Rice Variety, ADT39. *Current Science, 93*, 678-683.

[3] Ramesh, M., Murugiah, V. and Guota, A.K., **2009**. Efficient *In Vitro* Plant Regeneration via Leaf Base Segments of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology,* 47, 68-74.

[4] Hussein, E.H.A., Madkour, M.A., Assem, S.K. and Radwan, M.A., **2004**. Embryogenic Callus Formation and Plant Regeneration from Immature Embryos of Some Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* L.). *Arab Journal of Biotechnology*, 7, 111-122.

[5] Kumar, K.K., Maruthasalam, S., Loganathan, M., Sudhakar, D. and Balasubramanian, P., **2005**. An Improved Agrobacterium-Mediated Transformation Protocol for Recalcitrant Elite Indica Rice Cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 67-73.

[6] Jubair, T.A., Salma, U., Haque, N., Akter, F., Mukti, I.J., Haque, A.K.M.F. and Ali, M.R., **2008.** Callus Induction and Regeneration of Local Rice (*Oryza sativa* L.) Variety Topa. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7, 514-517.

[7] Khanna, H.K. and Raina, S.K., **1998**. Genotype x Culture Medium Interaction Effects on Regeneration Response of Three Indica Rice Cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 145-153.

[8] Ali, S., Qing-Zhong, X. and Xinan-Yin, Z., **2004**. Assessment of Various Factors Involved in the Tissue Culture System of Rice. *Rice Science*, 11, 345-349.

[9] Tariq, M., Ali, G., Hadi, F., Ahmad, S., Ali, N. and Ali, S.A., **2008**. Callus Induction and *In Vitro* Plant Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) under Various Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11, 255-259.

[10] Chen, L., Zhang, S., Beachy, R.N. and Fauquet, C.M., **1998**. A Protocol for Consistent, Large-Scale Production of Fertile Transgenic Rice Plant. *Plant Cell Report*, 18, 25-31.

[11] Hyeong, C.J., Yong L.J. and Wook, K.Y., **2004**. Improvement of Shoot Regeneration from Scutella-Derived Callus in Rice. *Korean Journal of Crop Science*, 49, 52-60.

[12] Zaidi, M.A., Narayanan, M., Sardana, R., Taga, I., Postel, S., Johns, R., McNulty, M., Mottiar, Y., Mao, J., Loit, E. and Altosaar, I., **2006**. Optimizing Tissue Culture Media for Efficient Transformation of Different Indica Rice Genotypes. *Agronomy Research*, 4, 563-575.

[13] Kumria, R. and Rajam, M.V., **2002**. Alteration in Polyamine Titers during Agrobacterium-Mediated Transformation of Indica Rice with Ornithine Decarboxylase Gene Affects Plant Regeneration Potential. *Plant Science*, 162, 769-777.

[14] Lentini, Z., Reyes, P., Marinez, C.P. and Roca, W.M., **1995**. Androgenesis of Highly Recalcitrant Rice Genotypes with Maltose and Silver nitrate. *Plant Science*, 110, 127-138.

[15] Bagheri, N., Jeloder, B.N. and Ghanbari A., **2009**. Evaluation of Effective Factors in Anther Culture of Iranian Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Biharean Biologist*, 3, 119-124.

[16] Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K., **1996**. Plant tissue culture, theory and practices. A revised edition. Amsterdam, Elseveir Publishers, 50-51.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Carbon Sourcese and Gelling Agents on Callus Induction and Regeneration Efficiency of Thai Rice (*Oryza sativa* L. cv. RD6)

Panutat Darachai[1], Sutee Chutipaijit[1], Kanokporn Sompornpailin[1, 2*]

[1]College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand
[2]Thailand Center of Excellence in Physics, CHE, Ministry of Education, Bangkok, 10400, Thailand
*Corresponding author. Email: kskanokp@kmitl.ac.th

Abstract—**The effect of carbon sources (20-30 gL^{-1} of sucrose or maltose) and supporting materials using gelling agents (starch, agar or Phytagel^{TM}) in callus induction media were investigated for the improvements of callus regeneration frequency. Four-week-old calli derived from sterile seed cultured on S4 medium (20 gL^{-1} sucrose, 8 gL^{-1} agar and 10 gL^{-1} starch) in the dark condition showed the highest frequency of callus induction (94%). However, after transferred calli into the regeneration medium containing 30 gL^{-1} maltose and 5 gL^{-1} Phytagel^{TM} for 4 weeks, the result presented that callus derived from M2 medium (30 gL^{-1} maltose and combination of 2 gL^{-1} agar and 4 gL^{-1} Phytagel^{TM}) presented 100% of green spots and 69% of plant regenerations higher than those of other media following with S1 medium (30 gL^{-1} sucrose and 8 gL^{-1} agar). Calli derived from induction media containing starch presented high phenolic compound but regeneration plants have better characteristics. The callus induction media containing maltose as carbon sources and suitable gelling agents significantly affected on the frequency of plant regeneration in Thai *indica* rice cv. RD6.**

KEYWORDS—**Carbon source, RD6, Regeneration, Maltose, Supporting material**

I. Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the major food crops in the world. More than 90% of cultivated rice is produced and consumed in Asia [1]. The cultivated rice consists of the two major subspecies including *indica* (*Oryza sativa* ssp. *indica*) and *japonica* (*Oryza sativa* ssp. *japonica*). The *indica* rice is widely cultivated about 80% especially in South-East Asia region [2]. Several biotic and abiotic stresses have been affecting and limiting in rice production. Therefore, the investigation of a highly efficient method of rice regeneration using tissue culture system will accelerate the successful application of genetic transformation and micropropagation to improvement of rice cultivars [3]. The callus initiations from cultured explants, proliferation, and then subsequent regeneration are the main step for plant regeneration efficiency [4].

Various factors are crucial in managing plant regeneration frequency. Cultivars and the nutrient compositions of the culture medium are the major source in regeneration frequency. Successful callus induction and regeneration have been reported in many cultivars of *japonica* rice. However, the success for reproducible plant regeneration has been limited in *indica* rice cultivars [5].

The objective of the study was to compare the differences in carbon sources and supporting materials for the enhancement of regeneration frequency in Thai *indica* rice cv. RD6. This study may be aid future work to establish micropropagation and production of transgenic plant for genetic transformation systems.

II. Materials And Methods

A. *Plant material, sterilization and callus induction*

Mature seeds of the Thai *indica* rice cv. RD6 were dehusked by hand. Surfaces were sterilized by immersion in 70% ethanol for 2-3 min and followed by immersion in 5% commercial beach (5.25% sodium hypochlorite) for 40 min and 30% commercial beach (5.25% sodium hypochlorite) for 30 min. After five times rinsed with the sterilized distilled water, seeds were cultured on various media (Table 1) containing NB basal medium [6]. The pH of the media was adjusted to 5.6-5.8 prior to autoclaving. The explants were incubated in the dark condition at 25±2°C for 4 weeks. Calli induction from cultured seeds were recorded after 4 weeks culture and scored as the percentages of callus induction. It was calculated using the formula:

$$\%\text{ Callus induction} = \frac{\text{No. of seeds produced calli}}{\text{No. of cultured seeds}} \times 100$$

B. *Plant regeneration*

After 4 weeks, derived calli were desiccated by placed on sterilized Whatman No.1 filter papers and kept in the dark condition at 25±2°C for 1 week. After desiccation, calli were transferred to regeneration medium (NB medium supplemented with 30 gL^{-1} maltose, 1 mgL^{-1} IAA, 2 mgL^{-1} BA, 2 mgL^{-1} kinetin and solidified with 5 gL^{-1} Phytagel^{TM}) and cultured at 25±2°C, 16 h photoperiod and 1000 lux light intensity for 4 weeks. The numbers of green spots and regenerated plants were recorded every 4 weeks. The percentages of green spots and plant regenerations were calculated using the formula:

$$\%\text{ Green spots} = \frac{\text{No. of calli produced green spots}}{\text{No. of cultured callus}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ Plant regenerations} = \frac{\text{No. of calli produced shoot buds}}{\text{No. of cultured callus}} \times 100$$

C. Experimental design and Data analysis

All experiments were designed in Completely Randomized Design (CRD) with three replications and each replication per treatment contained 20-30 explants. Statistical analysis of data form the experiments was performed with Duncan's multiple range test (DMRT) using SPSS software (SPSS for Windows version 15, SPSS Inc., Chicago, USA).

Table 1. Composition of various carbon sources and supporting materials in basal callus induction medium (NB medium + 0.3 mgL^{-1} kinetin + 2 mgL^{-1} 2,4-D).

Media	Carbon sources	Supporting materials
S1	30 gL^{-1} sucrose	8 gL^{-1} agar
S2	30 gL^{-1} sucrose	2 gL^{-1} agar + 4 gL^{-1} Phytagel^{TM}
S3	30 gL^{-1} sucrose	8 gL^{-1} agar + 10 gL^{-1} starch
S4	20 gL^{-1} sucrose	8 gL^{-1} agar + 10 gL^{-1} starch
M1	30 gL^{-1} maltose	8 gL^{-1} agar
M2	30 gL^{-1} maltose	2 gL^{-1} agar + 4 gL^{-1} Phytagel^{TM}
M3	30 gL^{-1} maltose	8 gL^{-1} agar + 10 gL^{-1} starch
M4	20 gL^{-1} maltose	8 gL^{-1} agar + 10 gL^{-1} starch

III. Result And Discussion

In this research, the types and concentrations of carbon sources and supporting materials were tested for callus induction and regeneration frequency. The different carbon sources and gelling agents in media affected on callus induction from mature seeds are shown in Fig. 1 and 2. The percentages of callus induction and quality of callus among the several of callus induction media were significant differences.

When the mature seeds were cultured on the callus induction media, the generated calli from S2 and M2 media were a friable whitish. While the calli from S1 and M1 media were pale yellowish and the other were browning in colour (Fig. 1).

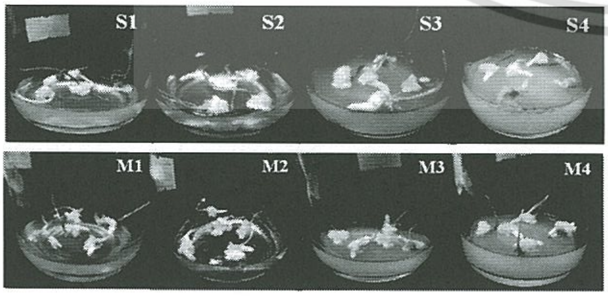


Figure 1. The callus formation from mature seeds of Thai *indica* rice cv. RD6 were cultured on S1-S4 and M1-M4 media in dark condition for 4 weeks

The percentages of callus induction in the various media varied from 82% to 94%. Among the various media, the mature seeds cultured on the S4 medium were 94% callus induction. This medium was significantly higher than induced-seeds from the other media at $p \leq 0.05$ (Fig. 2).

Calli derived from different induction medium were desiccated for 1 week and transferred to regeneration medium. The yellowish or whitish calli, differentiated to green spots and regenerated into plant within 2-4 weeks. Green spots and plant regenerations of the calli derived from the several of callus induction media were determined (Fig. 3 and 4).

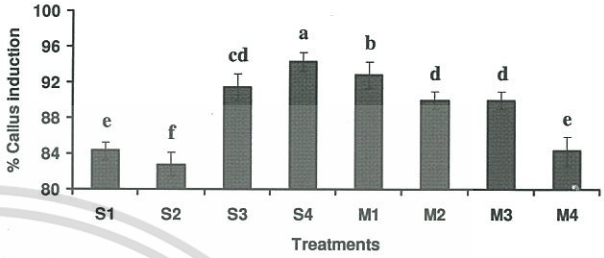


Figure 2. Histogram showing the percentages of callus induction from mature seeds in Thai *indica* rice cv. RD6. The explants were cultured on S1-S4 and M1-M4 media in dark condition for 4 weeks. The data were presented means ± S.D. of three replicates. Different letters above the bars indicated significant difference at $p \leq 0.05$.

However, the high percentages of callus induction (S4 medium) were not suitable for green spot and regeneration productions. The result indicated that calli, which cultured on S4 medium, may be a non-embryogenic calli more than embryogenic calli. Calli cultured on medium containing starch (S3-4 and M3-4) secreted phenolic compound in the medium more than those of non-starch treatments. However, the regenerated plant from these calli presented the better characteristics.

The treatment of calli derived from M2 medium (maltose as a carbon source and combination of agar and Phytagel^{TM} as supporting materials) presented the highest percentages of green spots and plant regenerations, after 4 weeks of callus cultured on regeneration medium. This treatment showed 100% and 69% in green spots and plant regenerations, respectively while S1 and S3 treatments presented 56% and 50% in plant regeneration respectively.

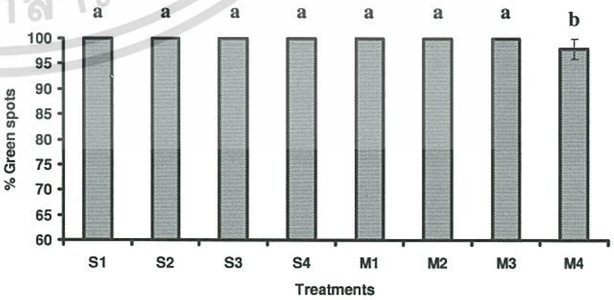


Figure 3. The percentages of green spot frequency from calli explants of Thai *indica* rice cv. RD6 on regeneration medium in light condition for 4 weeks. The data were presented means ± S.D. of three replicates. Different letters above the bars indicated significant difference at $p \leq 0.05$.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

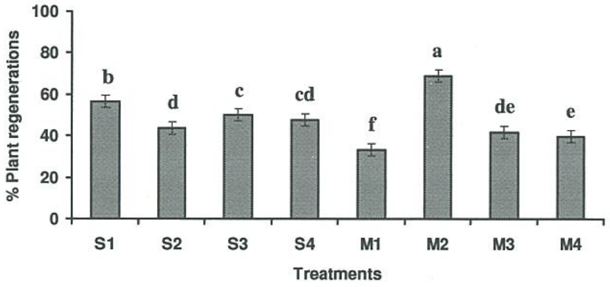


Figure 4. The percentages of regeneration frequency from calli explants of Thai *indica* rice cv. RD6 on regeneration medium in light condition for 4 weeks. The data were presented means ± S.D. of three replicates. Different letters above the bars indicated significant difference at $p \leq 0.05$.

This investigation revealed that both carbon sources and supporting materials mainly affect on callus induction and subsequent plant regeneration frequency. Embryogenic calli from proper callus induction medium will be suitable for high plant regeneration frequency [7]. Several reports indicated that the differentiation of the concentrations and types in carbon sources can influence and enhance the efficiency of plant regenerations [8, 9]. This result indicated that the use of maltose as carbon sources in culture medium may better than the use of sucrose because sucrose-containing medium can cause the browning calli by the ethylene induction in plant cell [10].

Phytagel^{TM} is the popular alternative agent. It is a complex extra-cellular polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea* and contains less free minerals and impurities than agar. The pH of medium are often drops after culturing but the pH of medium solidified with Phytagel^{TM} tends to be more stable [11]. Therefore, medium that using Phytagel^{TM} as a supporting material may be a suitable agent for enhance plant regeneration frequency. In addition, osmotic stress induced by the various types and concentrations of carbohydrates and a gelling agent have been reported to be beneficial for plant regeneration in rice [12, 13].

IV. CONCLUSION

This study would suggest that the use of maltose as a carbon source and agar and Phytagel^{TM} as supporting materials in callus induction medium from mature seeds in Thai *indica* rice cv. RD6 enhanced regeneration frequency in the rice regeneration medium. Improvement of somatic embryogenesis and regeneration system could be benefited to improve quantity of plant propagation and application in the genetic engineering efforts on Thai rice and the other crop species in the future.

V. REFERENCES

[1] S.K. Datta, "Rice Biotechnology a Need for Developing Countries", *AgBioForum*, Vol. 7, pp. 31-35, 2004.

[2] M. Ramesh, V. Murugiah and A.K. Gupta, "Efficient *In Vitro* Plant Regeneration via Leaf Base Segments of *Indica* Rice (*Oryza sativa L.*)", *Ind. J. Exp. Biol.*, Vol. 47, pp. 68-74, 2009.

[3] J. Zhang, Q. Feng, C. Jin, D. Qiu, L. Zhang, K. Xie, D. Yuan, B. Han, Q. Zhang and S. Wang, "Features of The Expressed Sequences Revealed by a Large Scale Analysis of ESTs From a Normalized cDNA Library of The Elite Indica Rice Cultivar Minghui 63", *Plant J.*, Vol. 42, pp. 772-780, 2005.

[4] D. Snezana, Ivic-Haymes and A.C. Smigocki, "Identification of Highly Regenerative Plants within Sugar Beet (*Beta vulgaris L.*) Breeding lines for Molecular Breeding", *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, Vol. 41, pp. 483–488, 2005.

[5] A. Biswas and A.B. Mandal, "Plant Regeneration in Different Genotypes of *Indica* Rice", *Ind. J. Biotec.,* Vol. 6, pp. 532-540, 2007.

[6] L. Li, R. Qu, A. De. Kochko, C. Frauquet and R.N.Beachy, "An Improved Rice Transformation Method Using The Biolistic Method", *Plan Cell Rep.*, Vol. 12, pp. 250-255, 1993.

[7] L. Khaleda and M. Al-Forkan, "Genotypic Variability in Callus Induction and Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis of Five Deepwater Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars of Bangladesh", *Afr. J. Biotechnol.*, Vol. 5, pp. 1435-1440, 2006.

[8] J.H. Cho, J.Y. Lee and Y.W. Kim, "Improvement of Shoot Regeneration from Scutellum - Derived Callus in Rice", *Korea. J. Crop. Sci.*, Vol. 49, pp. 52-60, 2004.

[9] S.M. Saqlan Naqvi, T. Sultana, T. Yasmin, T. Mahmood and M.S. Akhtar, "Efficient Embryogenic System from Tissue Culture of' Mature Embryos for some coase Varieties of Rice (*Oryza sativa L.*)", *Pak. J. Bot.*, Vol. 38, pp. 969-975, 2006.

[10] M.A. Zaidi, M. Narayanan, R. Sardana, I.Taga, S. Postel, R. Johns, M. McNulty, Y. Mottiar, J. Mao, E. Loit and I. Altosaar, "Optimizing Tissue Culture Media for Efficient Transformation of Different Indica Rice Genotypes", *Agron. Res.*, Vol. 4, pp. 563-575, 2006.

[11] H. Afrasiab and R. Jafar, "Effect of Different Media and Solidifying Agents on Callogenesis and Plant Regeneration from Different Explants of Rice (*Oryza sativa L.*) Varieties Super Basmati and IRRI-6", *Pak. J. Bot.*, Vol. 43, pp. 487-501, 2011.

[12] H. Moon and D.F. Hildebrand, "Effects of Proliferation Maturation, and Desiccation Methods on Conversion of Soybean Somatic Embryos", *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, Vol. 39, pp. 623–628, 2003.

[13] A.P. Korbes and Droste, "A. Carbon Sources and Polyethylene Glycol on Soybean Somatic Embryo Conversion", *Pesq. Agropec. Bras.* Vol. 40, pp. 211–216, 2005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้