BRT 542075

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและการแสดงออกของยีน ในข้าวแปลงพันธุ์บางชนิด

STUDY ON CYTOLOGY, PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND GENE EXPRESSION IN SOME TRANSGENIC RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

นางสาวทศพร พิพัฒน์ภานุกูล

วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ.2547

ISBN 974-659-111-8

P51

26 ก.ค. 2547

BRT
The Thai Response to Biodiversity

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและการแสดงออกของยีน ในข้าวแปลงพันธุ์บางชนิด

STUDY ON CYTOLOGY, PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND GENE EXPRESSION IN SOME TRANSGENIC RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

นางสาวทศพร พิพัฒน์ภานุกูล

วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2547
ISBN 974-659-111-8

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและการแสดงออกของยีนในข้าวแปลงพันธุ์บางชนิด

นางสาวทศพร พิพัฒน์ภานุกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2547

ISBN 974-659-111-8

STUDY ON CYTOLOGY, PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND GENE EXPRESSION IN SOME TRANSGENIC RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

MISS THODSAPORN PIPATPANUKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY

2004

ISBN 974-659-111-8

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปริญญา
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาชีววิทยา

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ : การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา สัณฐานวิทยา และการแสดงออกของยีนในข้าวแปลงพันธุ์บางชนิด

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นางสาวทศพร พิพัฒน์ภานุกูล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ :

....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. มานิต โฆษิตตระกูล)

....
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมหมาย ปรีเปรม)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วันชัย สุ่มเล็ก)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

BRT 542075

ทศพร พิพัฒน์ภานุกูล. 2547. การศึกษาเซลพันธุศาสตร์ สรีรวิทยา สัณฐานวิทยาและการแสดงออกของยีนในข้าวแปลงพันธุ์บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [ISBN 974-659-111-8]
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค, รศ.ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์, รศ.ดร. มานิต โฆษิตตระกูล

บทคัดย่อ

ความเข้มข้นของแคลเซียมไฮโปคลอไรต์และระยะเวลาฟอกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวภายนอกของเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรี และชัยนาท 1 คือ 1.5% (w/v) 45 นาที และ 2%(w/v) 45 นาที ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวให้เจริญเป็นแคลลัสพบว่าอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v), 2,4-D 22.5 µM และผงวุ้น 0.8%(w/v) ภายใต้สภาวะที่มีแสงมีประสิทธิภาพในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นแคลลัสสูงที่สุด โดยเมล็ดมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 92.67% และเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดเท่ากับ 90.9% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v), 2,4-D 18 µM และผงวุ้น 0.8%(w/v) ภายใต้สภาวะที่มีแสง การศึกษาอิทธิพลของ NAA และ BA ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวให้เจริญเป็นต้นใหม่พบว่า อาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v) ร่วมกับ NAA 2.5 µM และ BA 13.5 µM เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นต้น โดยแคลลัสมีการเจริญเป็นต้น 46.76% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 9.7 ต้น และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีให้เจริญเป็นต้นคืออาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v), NAA 2.5 µM , BA 18 µM และผงวุ้น 0.8% (w/v) โดยแคลลัสมีการเจริญเป็นต้นได้เท่ากับ 53.3% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 7.8 ต้น การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินและซีโฟแทคซีมต่อการเจริญเป็นต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมกานามัยซิน 50 มก./ล. เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกต้นข้าวแปลงพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินและซีโฟแทคซีม 250 มก./ล. เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีผลยับยั้งการเจริญเป็นต้นของแคลลัส

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซินลินต่อการเจริญของ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่าซีโฟแทคซีมมีประสิทธิภาพในการกำจัด *A. tumefaciens* สูงกว่าคาบินิซิลิน และความเข้มข้นของซีโฟแทคซีมที่เหมาะสมสำหรับกำจัด *A. tumefaciens* คือ 200 มก./ล. การส่งถ่ายยีนสู่เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) ที่มียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และ EHA105 (pCAMBIA1301) ที่มียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่ามี

การเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 5.8% และ 3.7% ตามลำดับ การเกิดแคลลัสข้าวของพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินคือ 2.8% และ 3.5% ตามลำดับ และตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวที่ผ่านการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) พบว่ามีการเกิดต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 3.2% และสามารถยืนยันผลการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

การนำต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และ T_1 ลงปลูกพบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์สามารถเจริญเติบโตและออกรวงให้ผลผลิตได้ โดยตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดและต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่นลูก และสามารถยืนยันการสอดแทรกของ T-DNA ในจีโนมข้าวรุ่น T_0 T_1 และ T_2 ด้วยเทคนิค PCR การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_0 และ T_1 พบว่าเมล็ดข้าวมีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินเท่ากับ 3:1 และ 1:1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 T_1 และ T_2 เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 ปกติพบว่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0, T_1 และ T_2 เปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติพบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n=24

BRT 542075

Thodsaporn Pipatpanukul. 2004. **Study on Cytology, Physiology, Morphology and Gene Expression in Some Transgenic Rice(*Oryza sativa* L.)**. Doctor of Philosophy Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University. [ISBN 974-659-111-8]
Thesis Advisors : Assoc. Prof. Sumontip Bunnag, Assoc. Prof. Piyada Theerakulpisut, Assoc. Prof. Manit Kosittrakun

ABSTRACT

The seeds of surface-sterilized Homsupanburee rice with 1.5%(w/v) calcium hypochlorite for 45 min showed no microbial contamination. The most effective condition for surface-sterilization of Chainat 1 rice seeds was 45 min in 2%(w/v) calcium hypochlorite. The highest percentage of callus induction at 92.67% was obtained when seeds of Homsupanburee rice were cultured on N_6 medium supplemented with 2%(w/v) sucrose, 18 µM 2,4-D and 0.8% bacto agar under light condition. The highest percentage of callus induction at 90.9% was obtained when seeds of Chainat1 rice were cultured on modified N_6 medium supplemented with 2%(w/v) sucrose, 22.5 µM 2,4-D and 0.8% bacto agar under light condition. The suitable regeneration medium for Homsupanburee rice was an N_6 medium supplemented with 2%(w/v) sucrose, 2.5 µM NAA ,18 µM BA and 0.8% bacto agar. Regeneration percentage was 53.3 and number of shoots/callus was 7.8. The suitable regeneration medium for Chainat1 rice was N_6 medium supplemented with 2%(w/v) sucrose, 2.5 µM NAA, 13.5 µM BA and 0.8% bacto agar. Regeneration percentage was 46.7 and number of shoots/callus was 9.7. A test was performed to determine the effect of kanamycin and cefotaxime on the regeneration of Chainat 1 rice calli. It was found that kanamycin at 50 mg/l was effective for the selection of transgenic rice and the minimum concentration of cefotaxime which was toxic to rice callus regeneration was 250 mg/l.

Experiments were performed to choose the best antibiotics for eliminating *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pBI121) and EHA105 (pCAMBIA1301). The results showed that cefotaxime was more effective in eliminating *A. tumefaciens* than carbenicillin. The suitable concentration of cefotaxime that was effective for eliminating *Agrobacterium* was 200 mg/l. Transformation of Homsupanburee and Chainat1 rice by *A. tumefaciens* were performed. *A. tumefaciens* strain LBA4404 harbored plasmid pBI121

containning *nptII* gene and *gus* gene and strain EHA105 harbored plasmid pCAMBIA1301 containing *hptII* gene and *gus* gene were used in this experiment. The results of transformation showed the generation of kanamycin-resistant Chainat1 and Homsupanburee rice calli at 5.8% and 3.7%, respectively. The generation of hygromycin-resistant Chainat1 and Homsupanburee rice calli were 2.8% and 3.5%, respectively. After co-cultivation with *A. tumefaciens*, *gus* activities were found in callus-derived seeds. The regeneration of kanamycin-resistant Chainat1 rice occurred at 3.2%. Integration of T-DNA in rice genome was confirmed by PCR.

Fertile transgenic RD6 rice was normally grown and self-pollinated seeds of T_1 and T_2 plants were obtained. In T_0, T_1 and T_2 generations, transgene integration were confirmed by PCR analysis. The study of inheritance of transgenes in T_1 and T_2 progenies showed that the transgenes were inherited and segregated in 3:1 and 1:1 ratios. Physiological and morphological studies in some hygromycin-resistant rice in comparison with non-transgenic rice exhibited no significant difference. A cytological study in root tip cells in T_0, T_1 and T_2 seeds showed that the chromosome number was 2n=24.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ และคำปรึกษาแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์ รศ.ดร. มานิต โฆษิตตระกูล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. อนวัช สุวรรณกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT 542075)

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาครูวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏ (พวส.) ที่ให้ทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในระหว่างการศึกษา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดระยะการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกคนที่อำนวยความสะดวกในการทำงาน

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่เอื้ออำนวยสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณสถานีทดลองข้าวจังหวัดขอนแก่น และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่เอื้ออำนวยสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนการศึกษาและให้กำลังใจ

ทศพร พิพัฒน์ภานุกูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว	2
ประเภทของข้าว	2
การชักนำการสร้างแคลลัสและการเกิดต้นใหม่ในข้าว (Induction and Regeneration in Rice)	4
ลักษณะทางชีววิทยาของ *A. tumefaciens*	10
ชีววิทยาโมเลกุลของ *A. tumefaciens*	10
การส่งถ่ายยีนสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดย *A. tumefaciens*	15
ปัจจัยส่งเสริมการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*	16
การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยวิธีตรง	18
ยีนรายงานผล (reporter gene)	21
ยีนคัดเลือก (selectable marker)	23
การนำยีนเครื่องหมายออกจากพืชแปลงพันธุ์	25
โปรโมเตอร์ (promotor)	27
การแสดงออกของยีน (gene expressing)	28
บทที่ 3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว	30
บทนำ	30
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	31
ผลการทดลอง	33
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 การส่งถ่ายยีน	53
บทนำ	53
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	54
ผลการทดลอง	59
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	77
บทที่ 5 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ สรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาในข้าวแปลงพันธุ์	82
บทนำ	82
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	82
ผลการทดลอง	87
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	131
เอกสารอ้างอิง	135
ภาคผนวก	155
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	156
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	159
ประวัติผู้เขียน	183

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัสโดยปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโป-คลอไรต์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ	34
ตารางที่ 2	การเกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* และ transformation rate ในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี	64
ตารางที่ 3	Segregation pattern ในเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เป็นรุ่นลูกของต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน	76
ตารางที่ 4	Segregation pattern ในเมล็ดข้าวรุ่นลูกของต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	103
ตารางที่ 5	Segregation pattern ของเมล็ดข้าวรุ่นลูกของต้นข้าวแปลงพันธุ์ กข6 ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	104
ตารางที่ 6	ลักษณะความสูงต้นเฉลี่ย ความกว้างใบธง ความยาวใบธง อัตรา-ส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	109
ตารางที่ 7	ลักษณะความสูงต้นเฉลี่ย ความกว้างใบธง ความยาวใบธง อัตรา-ส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	109
ตารางที่ 8	ลักษณะความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	115
ตารางที่ 9	ลักษณะความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	115
ตารางที่ 10	จำนวนกิ่งปฐมภูมิ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	121
ตารางที่ 11	จำนวนกิ่งปฐมภูมิ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	121

สารบัญตาราง(ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 12	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟส โดยนับจากปลายรากข้าวพันธุ์ กข6 และพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ผ่านการ pretreatment ในสารละลายและระยะเวลาต่าง ๆ	129

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะ Ti plasmid	11
ภาพที่ 2	แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM และ 18 μM ตามลำดับ	36
ภาพที่ 3	แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ สูตรที่ 1= 2,4-D 4.5 μM สูตรที่ 2= 2,4-D 9 μM สูตรที่ 3= 2,4-D 13.5 μM สูตรที่ 4= 2,4-D 18 μM สูตรที่ 5= 2,4-D 22.5 μM	37
ภาพที่ 4	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาทและหอมสุพรรณบุรีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ	37
ภาพที่ 5	แผนภูมิแสดงน้ำหนักสดของแคลลัสที่เจริญจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ	38
ภาพที่ 6	ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA	40
ภาพที่ 7	ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี (ข) บนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆเป็นเวลา 45 วัน สูตรที่ 1=ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต, สูตรที่ 2= NAA 2.5 μM+BA 4.5 μM, สูตรที่ 3= NAA 2.5 μM +BA 9 μM, สูตรที่ 4= NAA 2.5 μM +BA 13.5 μM, สูตรที่ 5= NAA 2.5 μM +BA 18 μM, สูตรที่ 6= NAA 5 μM +BA 4.5 μM, สูตรที่ 7= NAA 5 μM +BA 9 μM, สูตรที่ 8= NAA 5 μM +BA 13.5 μM, สูตรที่ 9= NAA 5 μM + BA 18 μM	41
ภาพที่ 8	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	42
ภาพที่ 9	แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสที่เจริญจากแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	42

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 10	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์หอม-สุพรรณบุรีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	43
ภาพที่ 11	แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสที่เจริญจากแคลลัสข้าวพันธุ์หอม-สุพรรณบุรีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ	43
ภาพที่ 12	ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ	45
ภาพที่ 13	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
ภาพที่ 14	แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้นต่าง ๆ	46
ภาพที่ 15	ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	46
ภาพที่ 16	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ชักนำให้เกิดต้นที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ	47
ภาพที่ 17	แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ	47
ภาพที่ 18	โครงสร้าง T-DNA ของพลาสมิด pBI121	56
ภาพที่ 19	โครงสร้าง T-DNA ของพลาสมิด pCAMBIA1301	56
ภาพที่ 20	ลักษณะวงใสที่เกิดขึ้นรอบกระดาษกรองที่เกิดจากอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ บนจานเพาะเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) ก. 0 มก./ล. ข. 50 มก./ล. ค. 100 มก./ล. ง. 150 มก./ล. จ. 200 มก./ล. ฉ. 250 มก./ล. ช. 300 มก./ล. ซ. 400 มก./ล.	60

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 21	แผนภูมิแสดงความยาวจากขอบกระดาษกรองถึงขอบของวงใสที่เกิดจากอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซินลินบนจานเพาะเชื้อ *A. tumefaciens*	61
ภาพที่ 22	ก. ลักษณะเมล็ดข้าวภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 3 วัน	63
	ข. ลักษณะแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน	
	ค. แคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน	
	ง. แคลลัสของข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน	
ภาพที่ 23	ก. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens*	65
	ข. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 pBI121 เป็นเวลา 5 วัน	
	ค. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA105 pCAMBIA1301 เป็นเวลา 5 วัน	
	ง. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 pBI121 เป็นเวลา 5 วัน	
	จ. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA105 pCAMBIA1301 เป็นเวลา 5 วัน	
ภาพที่ 24	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน อายุ 2 สัปดาห์ และเจริญบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล.	66
ภาพที่ 25	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 อายุ 45 วัน ที่ต้านทานต่อกานามัยซินและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล.	66

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 26	ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน ก. ใบข้าวอายุ 2 สัปดาห์, ข. ต้นข้าวอายุ 2 สัปดาห์, ค. ต้นข้าวอายุ 1 เดือน	67
ภาพที่ 27	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในรากและแผ่นใบของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน (ข และ ง) เปรียบเทียบกับรากและแผ่นใบของต้นข้าวควบคุม (ก และ ค)	67
ภาพที่ 28	ผลการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น lane 1: 100 bp, lane 2: pCaMV35S, lane 3-5: ดีเอนเอสกัดจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน, lane 6: ดีเอนเอสกัดจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ(ชุดควบคุม)	68
ภาพที่ 29	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินระยะออกรวง	69
ภาพที่ 30	ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 หลังจากยิงด้วยกระสุนที่เคลือบด้วยพลาสมิด pBI121 และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซิน 50 มก./ล.	70
ภาพที่ 31	ผลการตรวจสอบกิจกรรมของยีน *gus* ในแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี(ข) ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน pBI121 ด้วยวิธียิงกระสุน	71
ภาพที่ 32	ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ(ก. 0 มก./ล., ข. 50 มก./ล., ค. 100 มก./ล., ง. 150 มก./ล., จ. 200 มก./ล.)	73
ภาพที่ 33	แผนภูมิแสดงการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ	74
ภาพที่ 34	แผนภูมิแสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ	74
ภาพที่ 35	ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินรุ่น T_0 เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล.	75

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 36	ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ(ชุดควบคุม) (ก) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลง-พันธุ์ที่งอกบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. (ข)	76
ภาพที่ 37	แผนผังแสดงขั้นตอนการนำข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินลงปลูก	86
ภาพที่ 38	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 อายุ 1 เดือน เมื่อนำลงปลูกในดินกระถาง	88
ภาพที่ 39	ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ก) และใบข้าวพันธุ์ กข6 ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 (ข)	88
ภาพที่ 40	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ อายุ 3 เดือน (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 อายุ 3 เดือน (ขวา)	89
ภาพที่ 41	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติระยะออกรวง (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 ระยะออก-รวง (ขวา)	90
ภาพที่ 42	ลักษณะรวงข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	91
ภาพที่ 43	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 ระยะออกรวง	92
ภาพที่ 44	ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติระยะออกรวง(ก) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 (ข)	92
ภาพที่ 45	ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0(ก) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ข)	93
ภาพที่ 46	ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1(ก) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ข)	93
ภาพที่ 47	ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่ชักนำให้เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ(ก)เปรียบเทียบกับแคลลัสที่ชักนำให้เกิดจากเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อ ไฮโกรมัยซินรุ่น T_0(ข)	94

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 48 การแสดงออกของยีนในใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 94

ภาพที่ 49 ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น 95

ก. Lane 1: 100 bp, Lane 2: pCaMV35S, Lane 3-5: ดีเอนเอจากใบข้าวรหัส RD6-htp-1, RD6-htp-2 และ RD6-htp-3 ตามลำดับ, Lane 6: ดีเอนเอจากต้นข้าวพันธุ์ กข 6 (ชุดควบคุม)

ข. Lane 1 : 100 bp, Lane 2 : pCaMV35S, Lane 3-5 : ดีเอนเอจากใบข้าวรหัส RD6-htp-4, RD6-htp-5 และ RD6-htp-6 ตามลำดับ Lane 6 : ดีเอนเอจากต้นข้าวพันธุ์ กข 6 (ชุดควบคุม)

ภาพที่ 50 ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น 96

Lane 1 : 100 bp, Lane 2 : pCaMV35S, Lane 3 : RD6-hpt2-3, Lane 4 : RD6-hpt4-4, Lane 3 : RD6-hpt4-5, Lane 6 : RD6-hpt5-1, Lane7 : ต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1(ชุดควบคุม)

ภาพที่ 51 ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น 96

Lane 1 : 100 bp, Lane 2 : pCaMV35S, Lane 3 : RD6-hpt2-3-3, Lane 4 : RD6-hpt3-3-1, Lane 5 : RD6-hpt4-2-5, Lane 6 : RD6-hpt9-7-1, Lane7 : ต้นข้าวพันธุ์ กข6 (ชุดควบคุม)

ภาพที่ 52 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ 98

ภาพที่ 53 แผนภูมิแสดงอัตราการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์กข 6 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ 99

ภาพที่ 54 แผนภูมิแสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ 99

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 55 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกร-มัยซินรุ่น T_0 เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. ก. RD6-hpt1, ข. RD6-hpt2, ค. RD6-hpt3, ง. RD6-hpt4 (C=เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติบนอาหารไม่เติมไฮโกรมัยซิน, C+Hm= เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ บนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล., T+Hm= เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6แปลงพันธุ์บนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล.) 101

ภาพที่ 56 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. ก. RD6-hpt5, ข. RD6-hpt6, ค. RD6-hpt7, ง.RD6-hpt8 (C=เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติบนอาหารไม่เติมไฮโกรมัยซิน, C+Hm= เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ บนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล., T+Hm= เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6แปลงพันธุ์บนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล.) 102

ภาพที่ 57 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 อายุ 7 วัน 103

ภาพที่ 58 แผนภูมิแสดงค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 อายุ 1 เดือน และ 2 เดือน 106

ภาพที่ 59 แผนภูมิแสดงปริมาณคลอโรฟิลด์เอ, คลอโรฟิลด์บี และคลอโรฟิลด์รวมของใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 107

ภาพที่ 60 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างปริมาณคลอโรฟิลด์เอต่อคลอโรฟิลล์บีในใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้าน-ทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 108

ภาพที่ 61 แผนภูมิแสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 109

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 62	แผนภูมิแสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	109
ภาพที่ 63	ลักษณะใบธงของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ(ก) เปรียบเทียบกับใบธงของต้นข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์รุ่น T_1 (ข)	111
ภาพที่ 64	แผนภูมิแสดงความกว้างใบธงและความยาวใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	112
ภาพที่ 65	แผนภูมิแสดงความกว้างใบธงและความยาวใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	113
ภาพที่ 66	แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	114
ภาพที่ 67	แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	114
ภาพที่ 68	ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน (กลางและขวา)	116
ภาพที่ 69	ลักษณะเมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (แถวบน) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน (แถวล่าง)	116
ภาพที่ 70	ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	117
ภาพที่ 71	ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	118
ภาพที่ 72	แผนภูมิแสดงความกว้างเมล็ด, ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวรุ่นลูกของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	119

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 73	แผนภูมิแสดงความกว้างเมล็ด, ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวรุ่นลูกของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	120
ภาพที่ 74	ลักษณะรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ(ก) เปรียบเทียบกับรวงของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_1 (ข ค และ ง)	122
ภาพที่ 75	ลักษณะรวงของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 (จ ฉ และ ช)	123
ภาพที่ 76	แผนภูมิแสดงจำนวนกิ่งปฐมภูมิต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	124
ภาพที่ 77	แผนภูมิแสดงจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	124
ภาพที่ 78	แผนภูมิแสดงความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0	125
ภาพที่ 79	แผนภูมิแสดงจำนวนกิ่งปฐมภูมิต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	125
ภาพที่ 80	แผนภูมิแสดงจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	126
ภาพที่ 81	แผนภูมิแสดงความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1	126
ภาพที่ 82	ลักษณะต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติอายุ 4 วัน (ก)เปรียบเทียบกับกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 และ T_2 (ข และ ค)	127
ภาพที่ 83	ลักษณะต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติอายุ 10 วัน(ก) เปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานไฮโกรมัยซิน(ข)	127
ภาพที่ 84	แผนภูมิความสูงต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 อายุ 10 วัน	128

สารบัญภาพ(ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 85	ก. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ (2n=24)	130
	ข. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 (2n=24)	
	ค. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 (2n=24)	
	ง. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_3 (2n=24)	
ภาพที่ 86	ก. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ (2n=24)	130
	ข. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน (2n=24)	

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ก. = กรัม

ก./ล. = กรัมต่อลิตร

ชม. = ชั่วโมง

ซม. = เซนติเมตร

°ซ. =องศาเซลเซียส

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

มก./ล. = มิลลิกรัมต่อลิตร

M = โมลลาร์

mM = มิลลิโมลาร์

nm = นาโนเมตร

rpm = รอบต่อนาที

w/v = น้ำหนักต่อปริมาตร

µg = ไมโครกรัม

µM = ไมโครโมลาร์

µm = ไมโครเมตร

µl = ไมโครลิตร

ABA = abscisic acid

BA = benzyladenine

BAP = benzylaminopurine

GUS = beta-glucuronidase

GA = gibberellic acid

HCl = hydrochloric acid

KI = kinetin

NAA = naphthaleneacetic acid

psi = pounds per square inch

2,4-D =2,4-dichlorophenoxyacetic acid

IAA = indole-3-acetic acid

X-gluc = 5-bromo-4chloro-3-indole-β-D-glucoronides

บทที่ 1
บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากประชากรจำนวนมากกว่าหนึ่งในสามของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก พื้นที่การเพาะปลูกของข้าวมีประมาณ 11% ของพื้นที่เพาะปลูกทั่วโลก โดยเป็น พื้นที่ในทวีปเอเชียมากกว่า 90% ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกข้าวที่สำคัญประเทศหนึ่ง แต่ในปัจจุบันประเทศไทยผลิตข้าวได้น้อยลง อันมีสาเหตุมาจากโรค แมลงศัตรูข้าวและสภาพภูมิอากาศที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้จำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วส่งผลให้พื้นที่การเพาะปลูกลดลง ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พืชสายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ซึ่ง ได้แก่ พืชที่ให้ผลผลิตสูงทนทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสามารถกระทำได้ในระยะเวลาอันสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม(conventional breeding) การใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการส่งถ่ายยีนสู่พืช *A. tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยในดิน จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae *A. tumefaciens* สามารถส่งถ่ายชิ้นส่วนยีนที่มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินเข้าสู่โครโมโซมพืช และทำให้เซลล์พืชสังเคราะห์ฮอร์โมนเหล่านี้ในปริมาณสูงมากผิดปกติ ส่งผลให้พืชแบ่งเซลล์มากขึ้น ทำให้บริเวณที่ได้รับเชื้อมีลักษณะเป็นปุ่มปม (crown gall) ความสามารถตามธรรมชาติของ *A. tumefaciens* ที่สามารถส่งถ่ายข้อมูลทางพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์พืชทำให้เกิดแนวคิดในการสร้างพืชแปลงพันธุ์ โดยตัดยีนบริเวณที่มีรหัสการสังเคราะห์ฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินออกไป แล้วนำยีนที่ต้องการเข้าไปแทนที่ *A. tumefaciens* จะสามารถส่งยีนเหล่านี้เข้าไปในโครโมโซมพืชและทำให้พืชมีลักษณะตามที่ต้องการได้ การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *A. tumefaciens* เป็นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากบริเวณที่ส่งเข้าสู่พืชเป็นบริเวณที่มีการกำหนดขอบเขตที่แน่นอน ดังนั้นจึงไม่มีการจัดเรียงตัวใหม่ของชุดยีนที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมพืช (Dong *et al.*,1996) มีรายงานความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคนี้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความรู้เบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวบางสายพันธุ์ ได้แก่ หอมสุพรรณบุรี และชัยนาท 1 ซึ่งยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการสร้างข้าวแปลงพันธุ์ดังกล่าว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศไทยต่อไป

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae มีจำนวนโครโมโซม 2n=24 ข้าวที่ปลูกในปัจจุบันมี 2 ชนิด คือ *O. sativa* และ *O. glaberrima* ข้าวทั้งสองชนิดมีต้นกำเนิดมาจากข้าวป่า *O. perennis*

ลำต้นข้าวมีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งเป็นปล้อง ๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้องใบข้าวมีลักษณะบางแคบและเรียวยาว ปลายใบแหลมคล้ายปลายหอก และมีเส้นใบขนานกัน ใบประกอบด้วยกาบใบและแผ่นใบ กาบใบคือส่วนที่ติดอยู่กับข้อของลำต้นและห่อหุ้มต้นข้าว แผ่นใบคือส่วนที่อยู่เหนือข้อของใบและมีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง กาบใบและแผ่นใบเชื่อมติดกันด้วยข้อต่อใบ ใบข้าวใบสุดท้ายที่อยู่ติดกับรวงข้าวซึ่งมีความกว้างและสั้นมากกว่าใบอื่น ๆ เรียกว่า ใบธง และปล้องอันสุดท้ายที่เป็นก้านของรวงเรียกว่า คอรวง ช่อดอกข้าวเรียกว่ารวง เป็นช่อดอกแบบราซีม ดอกข้าวเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยกลีบดอกใหญ่ (lemma) และกลีบดอกเล็ก (palea) ส่วนปลายสุดของกลีบดอกใหญ่มีปลายแหลมยื่นออกมาเรียกว่าหาง (awn) ภายในกลีบดอกประกอบด้วยอับเรณูตัวผู้ 6 อัน ยอดเกสรตัวเมีย 2 อัน และรังไข่ 1 อัน การผสมเกสรของข้าวส่วนใหญ่เป็นแบบผสมตัวเอง เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนคัพภะ (embryo) ที่สามารถงอกเป็นต้นข้าว และส่วนเอนโดสเปิร์ม(endosperm) ซึ่งเป็นที่สะสมแป้งสำหรับการบริโภค

ประเภทของข้าว

O. sativa ปลูกในเขตต่าง ๆ ทั่วโลก เช่น เอเชีย ยุโรป อเมริกาใต้ และออสเตรเลีย ส่วน *O. glaberima* ปลูกในทวีปแอฟริกาเขตตะวันตก ในปัจจุบันมีพื้นที่การปลูก *O. glaberima* ลดลง เนื่องจากถูกแทนที่ด้วย *O. sativa* *O. sativa* แบ่งออกได้ 3 ประเภท ได้แก่ อินดิกา จาโปนิกา และจาวานิกา ข้าวอินดิกาเป็นข้าวที่ปลูกในเขตร้อน (tropical zone) เช่น ศรีลังกา จีนตอนกลางและตอนใต้ อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ ไทย และฟิลิปปินส์ ข้าวจาโปนิกาปลูกมากในเขตอบอุ่น (temperate zone) เช่น จีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น และเกาหลี นอกจากนี้พบมีการปลูกข้าวจาวานิกามากในประเทศอินโดนีเซีย พันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นข้าวอินดิกา

พันธุ์ข้าวในประเทศไทยแบ่งตามสภาพพื้นที่การปลูกได้ 3 ประเภท คือ ข้าวไร่ ข้าวนาสวน และข้าวขึ้นน้ำ ข้าวไร่คือข้าวที่เจริญเติบโตได้ในที่ดอนหรือที่สูงโดยไม่ต้องมีน้ำขัง มีความทนแล้งได้ดี ปลูกมากในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบางส่วนของภาคใต้ ข้าวนาสวน

คือข้าวที่เจริญเติบโตได้ในพื้นที่มีน้ำขัง และระดับน้ำลึกไม่เกิน 1 เมตร มีพื้นที่การปลูกทั่วประเทศ และข้าวขึ้นน้ำคือข้าวที่สามารถเจริญเติบโตได้ในระดับน้ำลึก เนื่องจากสามารถยืดปล้องให้ลำต้นยาวขึ้นตามระดับน้ำที่สูงขึ้นได้ ส่วนใหญ่ปลูกในเขตภาคกลาง

การแบ่งข้าวตามชนิดของแป้งที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดอาจแบ่งข้าวได้ 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวเหนียว (glutinous rice หรือ waxy rice) และข้าวเจ้า (nonglutinous rice) ข้าวเหนียวและข้าวเจ้ามีลักษณะของต้นและลักษณะอื่น ๆ เหมือนกัน ต่างกันที่เมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยแป้งอะไมโลเพกตินเป็นส่วนใหญ่ และมีอะไมโลสเป็นส่วนน้อยประมาณ 5-7% เมล็ดมีสีขาวขุ่น นิยมปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือของประเทศไทย เมล็ดข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้งอะไมโลสประมาณ 15-30% เมล็ดมีสีขาวใส ปลูกในทุกภาคของประเทศไทย

นอกจากนี้สามารถแบ่งประเภทของข้าวตามความไวต่อช่วงแสง โดยแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ข้าวไวแสงและข้าวไม่ไวแสง ข้าวไวแสงคือพันธุ์ข้าวที่ต้องการช่วงแสงสั้นกว่า 12 ชั่วโมงต่อวันในการออกดอก จึงปลูกได้เฉพาะในฤดูฝน ข้าวประเภทนี้แบ่งออกได้ 3 พวก คือ ข้าวเบา ข้าวกลาง และข้าวหนัก ข้าวเบาออกดอกระหว่างเดือนกันยายน-ตุลาคม ข้าวกลางออกดอกระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน และข้าวหนักออกดอกระหว่างเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่จัดเป็นข้าวหนัก ส่วนข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงคือพันธุ์ข้าวที่ออกดอกได้ทุกฤดูกาลเมื่ออายุครบตามกำหนด และปลูกได้ตลอดปีถ้ามีน้ำเพียงพอ

ข้าวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวเหนียวหอมคุณภาพดีพันธุ์แรกที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อาบด้วยรังสีแกมมาขนาด 20 กิโลแรด แล้วนำมาปลูกคัดเลือกเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105,65-G2U-68-254 คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ใช้ขยายพันธุ์ เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2520 และให้ชื่อว่าพันธุ์ กข 6 ข้าวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงมีทรงกอกระจาย ใบยาวสีเขียวเข้ม สูงประมาณ 154 ซม. เมล็ดยาวเรียว เปลือกสีน้ำตาลยาวประมาณ 7.23 มม. เมล็ดกว้างประมาณ 2.28 มม. และหนาประมาณ 1.77 มม. มีผลผลิตต่อไร่ 670 กิโลกรัมต่อไร่ (สำลี บุญวัฒนา, 2537) เนื่องจากข้าวพันธุ์ กข6 มีความทนแล้งได้ดีและให้ผลผลิตสูง กรมวิชาการเกษตรจึงแนะนำให้เป็นข้าวนาสวนพันธุ์ดีที่เหมาะสำหรับนาปีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล แต่ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว (ระรื่น บุญดวง และสมพล อุชชิน, 2533)

ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เป็นข้าวเจ้าที่ได้มาจากการผสม 3 ทาง ระหว่างข้าวพันธุ์ IR13146-158-1 IR15314-43-2-3-3 และ BKN 6995-16-1-1-2 ที่สถานีทดลองข้าวจังหวัดชัยนาท ในปี พ.ศ. 2525 และได้รับการรับรองให้ใช้ขยายพันธุ์เมื่อวันที่ 9 กันยายน พ. ศ. 2536 เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง มีลักษณะใบธงค่อนข้างยาวและตั้งตรง ใบแก่ช้า ต้นแข็งแรง คอรวงสั้น เมื่อปลูกในฤดูฝนมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 119 วัน และมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 130 วัน

เมื่อปลูกในฤดูแล้ง ในฤดูแล้งให้ผลผลิตเฉลี่ย 754 กก./ไร่ และในฤดูฝนให้ผลผลิตเฉลี่ย 725 กก./ไร่ เมล็ดมีลักษณะยาวเรียว เปลือกสีฟาง ท้องไข่น้อย มีปริมาณแป้งอะไมโลสสูง ข้าวเมื่อหุงสุกมีลักษณะร่วนแข็งคล้ายข้าวเสาไห้ สามารถนำไปแปรรูปเป็นเส้นก๋วยเตี๋ยว เส้นหมี่ ก๋วยจั๊บและขนมจีนได้ มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวหลายชนิด เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว โรคใบหงิก และโรคไหม้ ให้ผลผลิตสูงและตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนดี แต่ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้งและโรคใบสีส้ม (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

ข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีเป็นข้าวเจ้าหอมที่ได้มาจากการผสม 3 ทาง และคัดเลือกข้าวพันธุ์ผสมแบบสืบตระกูล ระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 ของ SPR84177-8-2-2-2-1 และ SPR85091-13-1-1-4 (แม่) กับขาวดอกมะลิ 105 (พ่อ) เมื่อปี พ. ศ. 2532 ที่สถานีทดลองข้าวสุพรรณบุรี จากการประเมินผลผลิตตามขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ของกรมวิชาการ-เกษตร ในระหว่างปี พ. ศ. 2533-2540 พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์รับรองที่มีอยู่ กรมวิชา-การเกษตรจึงรับรองให้ใช้ขยายพันธุ์เมื่อวันที่ 27 ตุลาคม พ. ศ. 2540 ลักษณะดีคือมีคุณภาพเมล็ดทางกายภาพและทางเคมีคล้ายข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปลูกได้ตลอดปีเนื่องจากเป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120 วันเมื่อปลูกแบบปักดำ ค่อนข้างต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง และเพลี้ยกระโดดหลังขาวดีกว่าขาวดอกมะลิ 105 แต่ค่อนข้างไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

การชักนำการสร้างแคลลัสและการเกิดต้นใหม่ในข้าว (Induction and Regeneration in Rice)

1. การเพาะเลี้ยงคัพภะ

รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวส่วนใหญ่เสนอว่าอาหารที่เติม 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 1-2 มก./ล. เหมาะสมต่อการชักนำคัพภะข้าวให้สร้างแคลลัส (ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม, 2537; สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และคณะ, 2537; Raman *et al.*, 1994 และ Pandey *et al.*, 1994) การเติม 2,4-D ร่วมกับสารชนิดอื่นสามารถส่งเสริมการชักนำคัพภะให้สร้างแคลลัสได้ เช่น อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ ไคเนติน (KI) ทริปโทเฟน(tryptophan) เคซีน-ไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate) และน้ำมะพร้าว (ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ, 2537) อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D NAA KI น้ำมะพร้าว และเคซีนไฮโดรไลเสท (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และคณะ, 2537) Cho *et al.*(1998) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ scutellum ที่ยังไม่เจริญเต็มวัยของข้าวบาร์เล่ย์พันธุ์ Golden Promise Galena และ Harrington ให้เกิดเป็นแคลลัสบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มก./ล ร่วมกับ benzylaminopurine(BAP) ความเข้มข้น 0.01 µM หรือ 0.1 µM และ cupric sulfate ความ-

เข้มข้น 5 μM ผลการศึกษาพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP และ copper ร่วมกับ 2,4-D เจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว Komamine *et al.*(1992) เสนอว่า 2,4-D มีผลชักนำให้มีการเจริญของแคลลัส แต่ยับยั้งการเจริญเป็นยอดและการกำเนิดคัพภะ(embryogenesis)ของแคลลัส Mitsuoka et al. (1994) รายงานว่า 2,4-D ชักนำเนื้อเยื่อของข้าวให้เกิดแคลลัสแบบ embryogenic callus แต่มีผลด้านลบต่อกระบวนการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัส โดยการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวแปรผกผันกับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่แคลลัสได้รับในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง Morita *et al.*(1999) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ภายในเซลล์ของแคลลัสข้าวกับการเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัส และรายงานว่าการควบคุมระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ภายในเซลล์ของแคลลัสให้อยู่ในระดับ 2.6×10^{-2} ไมโครกรัมต่อกรัม(น้ำหนักสด) สามารถเพิ่มการเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสให้สูงเท่ากับการเจริญเป็นต้นจากเมล็ดข้าวได้ Nuutila *et al.*(2002) รายงานว่าพืชในสปีชีส์เดียวกันอาจมีความต้องการองค์ประกอบของธาตุ-อาหารสำหรับกระบวนการกำเนิดคัพภะแตกต่างกัน Zhao *et al.*(1999) รายงานว่าการเติมน้ำมะพร้าวและกรดอะมิโนในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมการพัฒนาของ proembryo ให้เจริญเป็นคัพภะที่สมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pons *et al.* (2000) ที่กล่าวว่าการเติมกรดอะมิโนบางชนิด เช่น โพรลีน กลูตามีน และเคซีนไฮโดรไลซีน สามารถส่งเสริมการเกิด embryogenic callus ในข้าวพันธุ์ Senia, Tebre และ Bahia Pons *et al.* (2000) ศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน (NAA และ IAA) และไซโทไคนิน (BA และ KI) ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ Sepia, Tebre และ Bahia ให้เจริญเป็นต้นใหม่ และรายงานว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เกิดยอดมากกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไคเนติน ส่วนอาหารที่เติม NAA และ IAA มีผลต่อการเจริญของแคลลัสแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าว นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวบนอาหารที่เติม ABA ความเข้มข้น 10 มก./ล. เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ก่อนนำไปชักนำให้เกิดต้นมีผลเพิ่มการเจริญเป็นต้นใหม่ได้ Rueb *et al.* (1994) รายงานว่าแคลลัสอายุ 6 เดือนหรือมากกว่า 6 เดือนมีการเจริญเป็นต้นใหม่ต่ำกว่า แคลลัสอายุน้อย Yang *et al.* (1999) รายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ Taipei309 อายุ 6 เดือน ให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้บนอาหารที่เติม BA ความ-เข้มข้น 8.88 μM และ NAA ความเข้มข้น 5.37 μM ร่วมกับ ABA และการเติมโพรลีนความเข้มข้น 8.69 mM ในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัส ทำให้การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น 50% และมีการเจริญเป็นต้นใหม่เพิ่มขึ้น 60%

2. การเพาะเลี้ยงอับเรณู

การเพาะเลี้ยงอับเรณูและละอองเรณูมีประโยชน์ต่อการสร้างพืชที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว (haploid plant) สูตรอาหารและจีโนไทป์ของพืชเป็นปัจจัยสำคัญของการเพาะเลี้ยงอับเรณูพืชให้สร้างแคลลัส (Bishnoi *et al.*, 2000) Wassom *et al.* (2001) รายงานว่าสภาวะ-แวดล้อมขณะเพาะเลี้ยง รวมทั้งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ABA ร่วมกับ gibbererellic acid (GA) ในอาหารเพาะเลี้ยงและมีผลต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส Komamine *et al.* (1992) เสนอว่า 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงละออง-เรณูของข้าวให้เกิดแคลลัสและการเพิ่มจำนวนแคลลัส แต่มีผลยับยั้งการเจริญเป็นยอด และการกำเนิดคัพภะของแคลลัส Sun *et al.* (1992) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในสภาวะที่แตกต่างกันมีผลให้อับเรณูของข้าวมีการเกิดแคลลัสและต้นได้แตกต่างกัน โดยอับเรณูที่เพาะเลี้ยง ณ อุณหภูมิ 25.7°ซ. และได้รับแสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวัน สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และอับเรณูที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25.7°ซ. ได้รับแสงนาน 13.25 ชั่วโมงต่อวันมีการเจริญเป็นต้นสูงกว่า 20% Sun *et al.* (1993) ศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าว ได้แก่ ซูโครส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส แมนโนส ซอโบส ส่วนผสมระหว่างแมนนิทอลและซูโครส และส่วนผสมระหว่างซอบิทอลและซูโครส และรายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลมอลโทสสามารถชักนำอับเรณูของข้าวอินดิกาให้มีการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลชนิดอื่น ๆ Scott and Lyne (1994) รายงานว่าการบ่มละอองเกสรข้าวบาร์เล่ย์พันธุ์ Igri (*Hordeum valgaris L.*) ในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโทสความเข้มข้น 175 mM เหมาะสมต่อการพัฒนาละอองเรณูให้เป็นแคลลัส และเอ็มบริออยด์ (embryoids) แต่ละอองเรณูที่บ่มในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส กลูโคส หรือฟรักโทส ตายภายในเวลา 3 วัน Lentini *et al.* (1995) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และรายงานว่าอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโทสและ $AgNO_3$ สามารถเพิ่มการเกิดแคลลัสได้ 20.6% แต่อาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสทำให้การเกิดแคลลัสลดลง ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลมอลโทสความเข้มข้น 351 mM ทำให้แคลลัสมีการเจริญเป็นต้นใหม่เพิ่มขึ้น 15 เท่า Jahne and Lorz (1995) รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลมอลโทสเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของธัญพืชหลายชนิด เนื่องจากการแตก-สลาย(degradation) น้ำตาลมอลโทสในพืชเกิดขึ้นช้ากว่าการแตกสลายน้ำตาลซูโครสจึงรักษาค่าศักย์ออสโมซิส(osmotic potential) ของอาหารไว้ได้ดีกว่า นอกจากนี้การแตกสลายของน้ำตาลซูโครสยังก่อให้เกิดสารพิษ(toxin) ที่มีผลเสียต่อละอองเรณูอีกด้วย Pande and Bhojwani (1999) รายงานว่าการเติมน้ำตาลมอลโทสในอาหารเพาะเลี้ยงละอองเรณูข้าวมีประสิทธิภาพในการชักนำละอองเรณูให้มีกระบวนการ androgenesis ได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส 4 เท่า Zapata *et al.* (1990) รายงานว่าละอองเรณูของข้าวที่มีนิวเคลียสเดียว(uninucleate) สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าละอองเรณูที่มีสองนิวเคลียส(binucleate) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Afza *et al.*

(2000) ที่ศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงละอองเรณูที่มีนิวเคลียสเดียวมีการเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงละอองเรณูที่มีสองนิวเคลียส นอกจากนี้ยังรายงานว่าตำแหน่งของอับเรณูบนรวง-ข้าวของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Taipei309 มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกัน โดยอับเรณูที่อยู่ตำแหน่งด้านล่างของรวงให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าอับเรณูที่อยู่ตำแหน่งส่วนกลางและส่วนบนของรวง ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ (2537) รายงานว่าละอองเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105/IR 841-85-1-2 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105/บาสมาติ 370 ที่มีนิวเคลียสเดียวในระยะแรกเริ่ม (early uninucleate) และนำมาจากต้นข้าวที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่ถัดลงมาน้อยกว่า 5 ซม. ไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัส ละอองเรณูที่มีการเจริญเข้าสู่ระยะสองนิวเคลียสและนำมาจากต้นข้าวที่มีระยะห่างของข้อใบธงมากกว่า 12 ซม. เป็นระยะที่แก่เกินไป ไม่เหมาะต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเช่นกัน ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ และคณะ (2538) รายงานว่าแคลลัสที่เกิดจากอับเรณูของข้าวพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์สไคบอนเนท ขนาดประมาณ 1-2 มม. สามารถเจริญไปเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ Davinder *et al.* (1993) รายงานว่าการเติมน้ำมะพร้าวในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มการเกิดแคลลัสจากอับเรณูข้าวพันธุ์ Basmati 370 และพันธุ์ Pusa Basmati 1 ได้ Zheng *et al.* (2002) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงละอองเรณูของข้าวสาลีให้เกิดเป็นแคลลัส และเสนอว่าการเติมรังไข่ข้าวสาลีที่มีชีวิตในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารแก่ละอองเรณูสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การกำเนิดคัพภะจากแคลลัสได้ โดยการเพาะเลี้ยงละอองเรณูบนอาหารที่เติมรังไข่ในอัตราส่วน 10 รังไข่ต่ออาหาร 1 มล. เป็นเวลา 7-10 วัน ส่งเสริมให้แคลลัสเกิดคัพภะได้ดีที่สุด

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไซโกต(zygote) และเซลล์ไข่(ovule)

Zhao *et al.* (2000) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไซโกตของข้าวพันธุ์ Chun-jiang05 และ Xiao-gan01 และรายงานว่าการแยกเซลล์ไซโกตจากรังไข่โดยวิธีไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic method) ทำให้เซลล์ไซโกตมีการแบ่งตัวได้ดีและมีอัตราการรอดชีวิตสูง โดยเซลล์ไซโกตของข้าวพันธุ์ Chun-jiang05 และ Xiao-gan01 มีการแบ่งตัวได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 25-40 มก./ล. Kranz *et al.* (1995) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของข้าวสาลีให้แบ่งตัวและเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นโครงสร้างที่มีเซลล์จำนวนมากได้บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล. Holm *et al.* (1994) รายงานว่าเซลล์ไซโกตของข้าวบาร์เล่ย์ที่เลี้ยงบนในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก./ล. เจริญเป็นคัพภะได้ดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Zhang *et al.* (1999) ศึกษาการเพาะ-เลี้ยงเซลล์ไข่และเซลล์ไซโกตของข้าวพันธุ์ Taipei309 และพันธุ์ IR39 ให้เกิดแคลลัสบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก./ล., ซีเอทิน (zeatin) ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาล

มอลโทสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และพบว่าเซลล์ไซโกตมีการแบ่งตัวได้ดีที่สุดบนอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโทสความเข้มข้น 90 ก./ล. (pH 5.6)

4. การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ (protoplast)

โพรโทพลาสต์หมายถึงเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ การแยกโพรโทพลาสต์จากเนื้อเยื่อพืชนิยมแยกจากแผ่นใบ ใบเลี้ยง แคลลัสและเซลล์แขวนลอย อาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์มีองค์ประกอบธาตุอาหารใกล้เคียงกับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไป โดยมีปริมาณวิตามินและสารอินทรีย์บางชนิดมากกว่าปกติ และมีปริมาณแคลเซียมสูงเพื่อควบคุมความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ มีรายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของข้าวให้เจริญเป็นต้นใหม่ เช่น โพรโทพลาสต์ของเซลล์แขวนลอย (Biswas, 1994; Datta *et al*., 1992(a); Umoto *et al*., 1995; Zhang and Zhang, 1995; Tang *et al*.,2000) โพรโทพลาสต์ของเซลล์แขวนลอยที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (Su *et al*., 1992) โพรโทพลาสต์ของเซลล์มีโซฟิลล์ (Gupta and Pattanayak, 1993) และโพรโทพลาสต์ของเนื้อเยื่อ scutellar (Biswas, 1994) Lee *et al*. (1999) ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของข้าวด้วยวิธีต่าง ๆ และรายงานว่าโพรโทพลาสต์สามารถเจริญเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธี one layer of nylon mesh รองลงมาคือวิธี double layer of nylon mesh, membrane filter และวิธี agarose embedding ตามลำดับ Tang *et al*. (2000) ศึกษาการแยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของข้าวจาวานิกาพันธุ์ Azucena แล้วนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธี membrane filter nurse culture ซึ่งเป็นวิธีเลี้ยงโพรโทพลาสต์โดยอาศัยสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตจากเซลล์แขวนลอยของ *Lolium multiflorum* และเซลล์แขวนลอยของข้าวเป็นตัวช่วยโพรโทพลาสต์ในการเจริญเติบโต (nurse cells) และอาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล., KI 2.0 มก./ล. และน้ำตาลมอลโทส 3%(w/v) ชักนำโพรโทพลาสต์ให้เกิดแคลลัสได้

5. ปัจจัยอื่น ๆ นอกจากอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

นอกจากระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสูตรอาหารจะมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เกิดแคลลัสและเจริญเป็นต้นใหม่แล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นด้วย เช่น สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของแคลลัส (Raman *et al*., 1994) และเพิ่มจำนวนต้นต่อแคลลัสได้ (ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ, 2537) Mandal and Gupta (1995) รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 3-5% (w/v) เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าว แต่การเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงมากเกินไปอาจมีผลเสียต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ Xue *et al*. (1995) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ Yahkara ในอาหารสังเคราะห์ที่เติม ABA ความเข้มข้น 10 มก./ล. ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้

เกิดต้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นของแคลลัสได้ Kunanuvatchaidach *et al.* (1995) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร R-2 ที่เติม polyethylene glycol (PEG) ความเข้มข้น 100 ก./ล. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ Nam Sagui 19 ให้เจริญเป็นต้นได้มากกว่าปกติ 2 เท่า แต่พบว่าการเติม PEG ในอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีผลใด ๆ ต่อการเจริญเป็นต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 การทำให้แคลลัสแห้ง (partial desiccation) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวได้ (ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ, 2537; Rance *et al.*, 1994) Jain *et al.* (1996) รายงานว่าการทำให้แคลลัสของข้าว 2 พันธุ์ คือ Basmati 385 และ Pusa Basmati 1 อยู่ในสภาวะขาดน้ำ (water stress treatment) โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของอะกาโรสในอาหารเพาะเลี้ยงจาก 0.5% (w/v) ไปเป็น 1.0%(w/v) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ และทำให้การสร้างยอดในข้าวพันธุ์ Pusa Basmati เพิ่มขึ้นเป็น 86% แต่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอะกาโรสในอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีผลใด ๆต่อการสร้างยอดในแคลลัสข้าวพันธุ์ Basmati 385 ประภา ศรีพิจิตต์ (2532) ชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้สร้างยอดจำนวนมากโดยนำเมล็ดข้าวเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA, KI หรือ 2-isopentenyladenine (2-ip) และพบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 25 มก./ล. สามารถเจริญเป็นยอดได้ 68% มีจำนวนยอดต่อเมล็ดเท่ากับ 10.3 ยอด นอกจากนี้ยังเสนอว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นสูงสามารถชักนำเมล็ดให้สร้างต้นที่มีลักษณะปกติและมีจำนวนยอดสูงภายในระยะเวลาอันรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยของข้าวให้เกิดต้น Lutts *et al.*(1999) รายงานว่าการเติมสารบางชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัส ได้แก่ ABA, PEG, โพรลีน(proline), ทริปโตเฟน และ IAA มีผลให้แคลลัสข้าวจาโปนิกาพันธุ์ I Kong Pao และ Aiwu ที่ได้รับความเครียดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือในปริมาณสูง มีการเจริญเป็นต้นสูงขึ้น Hossain *et al.* (1997) รายงานว่าการเติมธาตุสังกะสี (zinc) ความเข้มข้น 520 µM ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ 146% เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารปกติ เนื่องจากสังกะสีกระตุ้น กลไกการทำงานของออกซินจึงทำให้การเจริญของเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้น Sahasrabodhe *et al.*(1999) รายงานว่าการเติม boric acid ในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลชักนำให้แคลลัสข้าวมีกระบวนการเกิดคัพภะเพิ่มขึ้น โดยการแคลลัสที่เจริญจากเนื้อเยื่อใบและรากมีกระบวนการเกิดคัพภะเพิ่มขึ้น 94% และ 80% เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม boric acid ความเข้มข้น 161.29 µM และ 241.93 µM ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่เจริญจากเนื้อเยื่อ scutellum มีกระบวนการเกิดคัพภะเพิ่มขึ้น 83% เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม boric acid ความเข้มข้น 161.29 µM Tsugawa and Suzuki (2000) รายงานว่าการเก็บรักษาแคลลัสของข้าวพันธุ์ Nipponbare และ Koshihikari ที่อุณหภูมิ 5°ซ. เป็นเวลา 5 เดือน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นใหม่

ทำให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นใหม่สูงกว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับความเย็นมาก่อน Pullman *et al.*(2003) รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม brassinolide ความเข้มข้น 0.1 µM ร่วมกับ 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสข้าวให้มีกระบวนการกำเนิดคัพภะเพิ่มขึ้น 10%

ลักษณะทางชีววิทยาของ *A. tumefaciens*

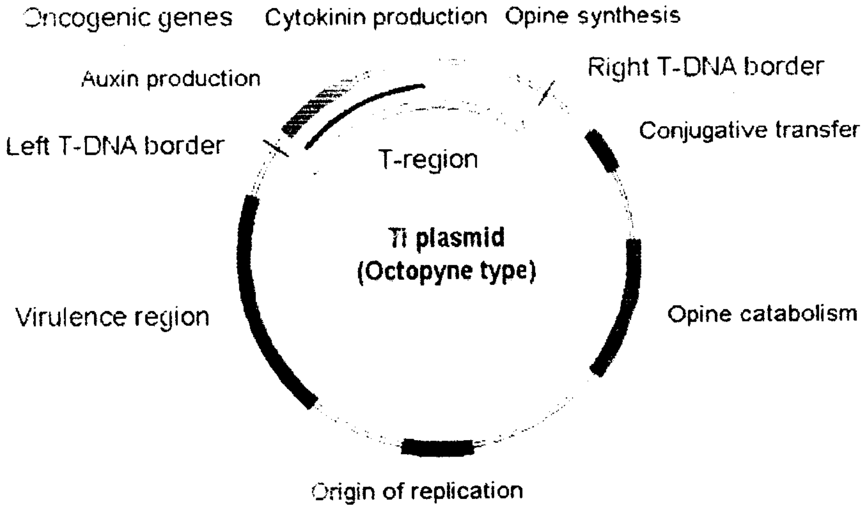
Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยในดิน จัดอยู่ในแฟมมิลี Rhizobiaceae มีรูปร่างเป็นท่อน มีขนาดประมาณ 0.6-1.0×1.0-3.0 µm หายใจแบบใช้ออกซิเจน เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาและไม่สร้างสปอร์ (Davey *et al.*, 1994) *Agrobacterium* ที่สำคัญพบมี 2 ชนิด ได้แก่ *A. tumefaciens* ก่อให้เกิดโรค crown gall และ *A. rhizogenes* ก่อให้เกิดโรค hairy root *A. tumefaciens* ผลิตสารโอพีนซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนและน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต และสามารถแบ่งประเภทของ *A. tumefaciens* ตามชนิดของสารโอพีนที่สร้างสารโอพีนที่พบใน *A. tumefaciens* มีหลายชนิด ได้แก่ ออกโทพีน (octopine), โนพาลีน (nopaline), ลิวซิโนพีน (leucinopine) และซักซินาโมพีน (succinamopine) (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2541)

ชีววิทยาโมเลกุลของ *A. tumefaciens*

ภายในเซลล์ *A. tumefaciens* มี extrachromosomal plasmid ขนาดใหญ่ ประมาณ 200 กิโลคู่เบส (kilobasepair) เรียกว่า tumor inducing (Ti) plasmid Ti plasmid ประกอบด้วยส่วนสำคัญต่าง ๆ ได้แก่ transferred DNA (T-DNA) region และ Virulence (*vir*) region T-DNA มีขนาดประมาณ 20-23 กิโลเบส ล้อมรอบด้วยลำดับเบสอนุรักษ์และมีลักษณะเป็นเบสซ้ำ ๆ กัน 25 คู่เบส(25 basepair conserved direct repeat) (Citovsky *et al.*, 1988; Tinland *et al.*, 1994) ทางด้าน upstream หรือ downstream ของ T-DNA มีลำดับดีเอนเอขนาด 24 คู่เบส เรียกว่า overdrive ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการขนส่งชิ้นส่วนดีเอนเอสู่พืช (Peralta *et al.*, 1986; Zambryski, 1992) บริเวณ T-DNA ประกอบด้วยยีนที่มีรหัสสำหรับการสร้างออกซินและไซโทไคนิน ได้แก่ ยีน *iaaM*, ยีน *iaaH* และยีน *ipt* *A. tumefaciens* จะส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชและสอดแทรกในโครโมโซมของพืช ทำให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการสังเคราะห์ออกซินและไซโทไคนินเพิ่มขึ้น และมีการแบ่งเซลล์มากผิดปกติ ดังนั้นบริเวณที่ติดเชื้อจึงมีลักษณะเป็นปุ่มปมเรียกว่า crown gall (Chilton *et al.*, 1997) และเซลล์ที่แบ่งตัวเป็น crown gall นี้ยังคงรักษาสภาพที่เป็นปุ่มปมไว้ได้ แม้ว่า *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคได้ถูกทำลายไปแล้วก็ตาม (Braun, 1958)

ยีน *iaaM* ชักนำให้เกิดการสร้าง IAA ได้ เนื่องจากมีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ mono-oxygenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนทริปโตเฟนให้เป็น indole acetamide (IAM) ยีน *iaaH* มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน IAM ให้เป็น IAA วิถีการสร้าง IAA จาก IAM

ที่เกิดขึ้นใน *A. tumefaciens* จะไม่พบในพืชปกติ โดยพืชปกติจะสร้าง IAA จาก indole pyruvic acid ยีน *ipt* มีรหัสสำหรับการสร้าง isopentenyl-transferase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา การสร้าง cytokinin isopentenyl-AMP จาก isopentenyl-pyrophosphate และ AMP จำนวนสำเนา(copy) ของ T-DNA ที่สอดแทรกในจีโนมพืช ตำแหน่งที่สอดแทรกและ methylation pattern จะมีอิทธิพลต่อปริมาณของออกซินและไซโทไคนินที่ถูกสังเคราะห์ในเซลล์พืช(Davey *et al.*, 1994) จากการศึกษาลำดับเบสของ T-DNA พบว่า T-DNA มี expression signal เหมือนในยูคาริโอต และ transcriptional factor บางชนิดของพืช เช่น TATA BOX (transcription initiation) AATAAA(transcription termination) และ polyadenylation (Barker *et al.*, 1983)



ภาพที่ 1 ลักษณะ Ti plasmid

vir region เป็นชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดประมาณ 40 กิโลเบส ประกอบด้วยโอเปอรอนที่สำคัญ 7 โอเปอรอน ได้แก่ *vir*A, *vir*B, *vir*C, *vir*D, *vir*E, *vir*G และ *vir*H ซึ่ง ร่วมกันทำหน้าที่ในกลไกการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช (Hookaas and Schilperoort, 1992) ยีน *vir* เหล่านี้มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน virulence (Vir) ซึ่งจะตอบสนองต่อสารประกอบฟีนอลที่หลั่งจากบาดแผลของพืช แล้วชักนำให้เกิดการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช บนโครโมโซมของ *A. tumefaciens* มียีน chromosomal virulence (*chv*) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (bacterial chemotaxis) โดย ยีน *chv*V และ *chv*B มีความสำคัญต่อการเกาะของ *A. tumefaciens* ที่ผนังเซลล์พืช (Douglas *et al.*, 1985) Canglosi *et al.* (1989) รายงานว่า

ยีน *chv*A มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของ *A. tumefaciens* และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง beta-1,2 glucan เข้าสู่ periplasm ของแบคทีเรีย ยีน *chv* มีการแสดงออกตลอดเวลาแต่ยีน *vir* จะแสดงออกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารประกอบฟีนอลที่หลั่งจากพืช (Hookaas, 1989) เมื่อพืชเกิดบาดแผลพืชจะหลั่งสารประกอบที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอล (pH 5.0-5.8) และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ลิกนินและฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลที่มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *vir* ได้แก่ acetosyringone และ alpha-hydroxyacetosyringone ซึ่งพบมากในเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล (Hookaas, 1989; Stachel *et al.*, 1985) Ditt *et al.*(2001) ศึกษาการตอบสนองของพืช *Ageratum conyzoids* ต่อการก่อโรคของ *A. tumefaciens* ด้วยเทคนิค transcription-PCR analysis และพบว่า *A. tumefaciens* ชักนำให้พืชเปลี่ยนแปลงการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ plant signal transduction และการตอบสนองป้องกัน(defense response)ได้

ยีน *virA* และ *vir*G มีการแสดงออกตลอดเวลาและทำหน้าที่ควบคุมการลอกรหัสของยีน *vir* อื่น ๆ และ *A. tumefaciens* กลายพันธุ์ที่มีความผิดปกติของยีน *virA* และ *vir*G จะสูญเสียความสามารถในการก่อโรค (Lewin, 1990) โปรตีน VirA เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของ *A. tumefaciens* ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณพิเศษที่ส่งมาจากพืชในรูปของสาร-ประกอบฟีนอล เมื่อ *A. tumefaciens* ได้รับสารประกอบฟีนอลแล้ว โปรตีน VirA จะทำหน้าที่เป็น protein kinase และ phosphorylase เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับตัวเอง (autophosphorylation) ที่ตำแหน่งฮีสติดีนที่ไม่เปลี่ยนแปลง (conserved histidine residue) จากนั้น phosphohistidine จะส่งหมู่ฟอสเฟตต่อให้กับโปรตีน VirG ที่ตำแหน่งแอสปาเตทอนุรักษ์ (conserved aspartate residue) แล้วโปรตีน VirG จะเข้าเกาะที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *vir* เพื่อชักนำให้มีการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีน Vir ชนิดอื่น ๆ ต่อไป (Jin *et al.*, 1990; Zambryski, 1992) Liu *et al.* (1992) รายงานว่าการเพิ่มจำนวนสำเนา (copy) ของยีน *virG* ใน Ti plasmid สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสู่ผักชีฝรั่ง แครอท และเนื้อเยื่อข้าวโดย *A. tumefaciens* ได้

การส่งถ่าย T-DNA เริ่มจากบริเวณขอบด้านซ้าย(left border) ของ Ti plasmid (Ramannathand and Veluthambi, 1995 ; Ramannathand and Veluthambi , 1996) โปรตีน VirD1 และ VirD2 ที่สร้างจากโอเปอรอน *vir*D จะร่วมกันทำหน้าที่เป็น endonuclease ที่มีตำแหน่งจดจำบริเวณ T-DNA border และตัดที่ตำแหน่งระหว่างเบสคู่ที่ 3 และ 4 ของ T-DNA border สายล่าง ทำให้เกิดดีเอนเอสายเดี่ยวขึ้น จากนั้นโปรตีน VirD2 จะยึดเกาะกับปลายด้าน 5′ ของ T-DNA ด้วยพันธะโคเวเลนท์ แล้วนำ T-DNA สายเดี่ยว หรือ T-strand ออกจากพลาสมิด (Ward และ Barnest, 1988) โปรตีน VirD2 ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ T-DNA ถูกทำลายโดยเอนไซม์ exonuclease ภายในเซลล์พืช และอาจมีส่วนร่วมในการนำ T-DNA เข้าสู่

เซลล์พืชและแทรกตัวเข้าสู่จีโนมพืช ระบบการทำงานของ VirD system มีลักษณะคล้ายกับกระบวนการคอนจูเกชั่น (conjugation) ที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด โดยในแบคทีเรียจะมีโปรตีน Mob หรือ Tra ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดที่บริเวณ origin of transfer และมีกลไกซ่อมแซมดีเอนเอสายเดี่ยวที่ขาดหายไปด้วยกระบวนการ displacement synthesis (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987) โปรตีน VirC ทำหน้าที่เกาะกับบริเวณ overdrive ของ T-DNA เพื่อส่งเสริมการสร้าง T-strand (van Haaren *et al.*, 1987) โปรตีน VirE2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 69 กิโลดาลตัน สร้างจากโอเปอรอน *vir*E ทำหน้าที่เกาะอยู่ที่ตลอดสายของ T-DNA (single strand binding protein) เพื่อป้องกัน ไม่ให้ T-DNA ถูกทำลายเมื่อเข้าสู่เซลล์พืชและรักษารูปร่างของ T-DNA ไม่ให้ม้วนงอ เพื่อความเหมาะสมในการเข้าสู่เซลล์พืช (Citovsky *et al.*, 1988) T-strand ที่รวมเป็น complex กับโปรตีน VirD2 และ VirE2 เรียกว่า T-complex (Zupan and Zambriski, 1995) โปรตีน VirE2 มีบริเวณที่เรียกว่า nuclear localization signal(NLS) ทำหน้าที่ชักนำให้มีการเคลื่อนตัวของ T-complex เข้าสู่นิวเคลียสของพืช (Howard *et al.*,1992; Tinland *et al.*,1994) โปรตีน VirB สร้างจากโอเปอรอน *vir*B (ประกอบด้วย 11 open reading frame) โปรตีน VirB เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของ *A. tumefaciens* และเชื่อว่าร่วมกันทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง multiprotein channel ที่บริเวณผนังเซลล์เพื่อให้ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชได้ (Sheng and Citovsky, 1996) โอเปอรอน *vir*H ประกอบด้วยยีน 2 ชนิด มีรหัสกำหนดการสร้างโปรตีนที่อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขับพิษ (detoxification) จากสารประกอบที่ *A. tumefaciens* ได้รับจากพืชบางชนิด และอาจมีผลยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* ได้ โอเปอรอน *vir*F มีรหัสกำหนดการสังเคราะห์โปรตีนขนาด 20 กิโลดาลตัน หน้าที่ของโปรตีน VirF ไม่ปรากฏแน่ชัด แต่พบว่าสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการส่งถ่าย T-DNA ในยาสูบและพืชหลายชนิด Narashihulu *et al.* (1996) รายงานว่าการส่งถ่ายยีนในยาสูบและข้าวโพดโดย *A. tumefaciens* กลายพันธุ์ที่มีความผิดปกติของยีน *virC* และ *virE* ทำให้การแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งเป็นยีนรายงานผลในต้นยาสูบและต้นข้าวโพดแปลงพันธุ์เกิดขึ้นช้าและน้อยกว่าปกติ

การแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืชเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการส่งถ่ายยีนและเป็นขั้นตอนที่ยังไม่ทราบกลไกส่วนใหญ่อย่างแน่ชัด Mayerhofer *et al.* (1991) เสนอรูปแบบการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืช เรียกว่า illegitimate recombination โดยกล่าวว่าการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืชอาจเป็นการแทรกตัวของ T-DNA สายเดี่ยว (single stranded gap-repair) หรือ T-DNA สายคู่(double stranded break-repair) อย่างใดอย่างหนึ่ง โดยการแทรกตัวของ T-DNA สายคู่เริ่มขึ้นเมื่อเกิด double strand break บนดีเอนเอพืช ต่อมาด้านปลายของ T-DNA จะจับคู่กับบริเวณที่มีโฮโมโลกัสบนดีเอนเอพืช ส่วนด้านปลายของ T-DNA ที่เกินออกไป (single strand overhangs) จะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ exonuclease หรือ endonuclease แล้วเอนไซม์ ligase จะเชื่อมด้านปลายของ T-DNA ทั้งสองสายและดีเอนเอพืช

เข้าด้วยกัน สำหรับการแทรกตัวของ T-DNA สายเดี่ยวในจีโนมพืชเริ่มขึ้นเมื่อมีการตัด (nick) เกิดขึ้นบนดีเอนเอพืชสายหนึ่ง ต่อมาเอนไซม์ 5′-3′ exonuclease จะทำหน้าที่ตัดปลายด้าน 5′ ของรอยตัดนั้นจนกระทั่งรอยตัดพัฒนาไปเป็น gap เนื่องจาก T-DNA และดีเอนเอพืชมี partial pairing ระหว่างกัน T-DNA สายเดี่ยวจึงสามารถแทรกตัวเข้าสู่บริเวณ gap ได้ และปลายด้าน 5′ และ 3′ ของ T-DNA ที่เกินออกไปจะถูกตัดออกไปแล้วเชื่อมต่อเข้ากับดีเอนเอพืชด้วยการทำงานของเอนไซม์ ligase เนื่องจากการจับคู่กันของ T-DNA และดีเอน-เอพืชมีลักษณะเป็น partial pairing จึงทำให้เกิดเป็นโครงสร้าง heteroduplex ขึ้น โครงสร้างนี้ส่งผลให้เกิดการตัดขึ้นบนดีเอนเอพืชสายที่สอง จากนั้นจึงมีการสร้าง T-DNA สายใหม่บนดีเอนเอพืชสายที่สองโดยกระบวนการ repair synthesis โดยเริ่มจากปลาย 3′ ของดีเอนเอพืช

ปัจจุบันเชื่อว่าปัจจัยภายในพืชมีส่วนร่วมในกระบวนการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืช Deng *et al.* (1998) รายงานว่าโปรตีน cyclophilin ซึ่งพบเป็นโปรตีนอนุรักษ์ (conserved protein)ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ พืชและสัตว์ มีส่วนร่วมในการแทรกตัวของ T-DNA โดย cyclophilin มีปฏิสัมพันธ์(interaction) ต่อโปรตีน VirD2 ทำให้โปรตีน VirD2 เปลี่ยนแปลงรูปร่าง(conformation) เพื่อทำหน้าที่นำ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช และการยับยั้งการทำงานของโปรตีน cyclophilin ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการส่งถ่ายยีนใน *Arabidopsis thaliana* และต้นยาสูบอีกด้วย Ziemienovicz *et al.* (2000) ศึกษาพบว่ากลไกการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืชเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ภายในพืชบางชนิด เช่น T4 DNA ligase ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมปลายด้าน 5′ ของ T-DNA เข้ากับดีเอนเอพืชโดยมี ATP เป็น cofactor และเสนอว่าโปรตีน VirD2 ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืช Bako *et al.* (2003) รายงานว่าปัจจัยอนุรักษ์(conserved nuclear factors) บางชนิดที่พบภายในนิวเคลียสของยูคาริโอตได้แก่ TATA-box binding protein และ CAK2M kinase มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแทรกตัวของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช Brunaud *et al.* (2002) เสนอว่าการแทรกตัวของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืชเกิดขึ้นบริเวณโปรโมเตอร์และบริเวณ transcribed chromatin domain ที่มีลำดับเบสอะดินีนและไทมีนอยู่มาก(A-T rich sequence) หลังจากนั้นโปรตีน VirD2 จะทำหน้าที่เชื่อมปลายด้าน 5′ ของ T-strand เข้ากับปลาย 3′ ของ gap บนดีเอนเอพืช Pawlowski and Somers (1998) ทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโอ๊ตโดย *A. tumefaciens* เพื่อศึกษาการแทรกตัวของยีนแปลกปลอม (transgene) ในจีโนมข้าวโอ๊ตแปลงพันธุ์และเสนอว่าการแทรกตัวของยีนแปลกปลอมตรงตำแหน่ง DNA replication forks จะทำให้ยีนแปลกปลอมมีการแทรกตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมพืช Stahl *et al.* (2002) เสนอว่ารูปแบบการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมข้าวบาร์เล่ย์มีลักษณะคล้ายกับการแทรกตัวของ T-DNA ที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่แต่แตกต่างกันที่การแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมข้าวบาร์เล่ย์เป็นการแทรกแบบ tandem direct repeat และเป็นการแทรกแบบ adjacent integration ที่เกิดขึ้นภายในโลคัสเดียวกัน Iglesias *et al.* (1997) และ Ansari and Gartenberg (1999) รายงานว่า

การแทรกตัวของยีนแปลกปลอมในตำแหน่งที่มีระยะทางไกลจากเซนโทรเมียร์ ทำให้ยีนแปลกปลอมมีการแสดงออกสูงและเสถียร แต่การแทรกตัวในตำแหน่งที่มีระยะทางใกล้กับเซนโทรเมียร์ ยีนจะมีการแสดงออกต่ำและไม่เสถียร ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณใกล้เซนโทรเมียร์มี heterochromatin มากกว่า ผลการศึกษานี้ขัดแย้งกับรายงานของ Jin *et al.* (2002) ซึ่งรายงานว่าตำแหน่งของการแทรกตัวไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนแปลกปลอม และการแทรกตัวของ T-DNA สามารถเกิดขึ้นทั่วไปในโครโมโซมพืช แต่พบว่าการแทรกตัวในตำแหน่งที่มีระยะทางไกลจากเซนโทรเมียร์จะเกิดขึ้นมากกว่าการแทรกตัวในตำแหน่งใกล้เซนโทรเมียร์ Ramannathand and Veluthambi (1996) เสนอว่า T-DNA ที่เข้าผ่านสู่นิวเคลียสพืชและไม่สามารถแทรกตัวในจีโนมพืชได้ อาจยังคงอยู่ในนิวเคลียสได้ในระยะเวลาหนึ่ง

การส่งถ่ายยีนสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดย *A. tumefaciens*

ในอดีตเชื่อว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่จัดเป็นพืชให้อาศัย(host) ของ *A. tumefaciens* ทั้งนี้เนื่องจากพืชให้อาศัยของ *A. tumefaciens* จะต้องเป็นพืชที่เกิดโรค crown gall เมื่อ *A. tumefaciens* เข้ารุกรานเท่านั้น แต่ไม่พบมีลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้นในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว Hooykaas-Van Slogteren *et al.* (1984) ศึกษาพบว่า *A. tumefaciens* สามารถรุกรานพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ แต่พืชไม่มีการสร้าง crown gall และรายงานว่า *Chlorophylum capense* (Liliaceae) และ *Narcissus* (Amaryillidaceae) ที่ส่งถ่ายด้วยพลาสมิดที่มียีนกำหนดการสร้างออกโทพีนและโนปาลีนสามารถสังเคราะห์ออกโทพีนและโนปาลีนได้ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถส่งถ่ายยีนสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดย *A. tumefaciens* ได้ และเชื่อว่ากลไกการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ที่เกิดขึ้นในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีรูปแบบคล้ายกับที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่ Hernalsteens *et al.* (1984) ศึกษาพบว่าหน่อไม้ฝรั่งที่ติดเชื้อ *A. tumefaciens* มีการเจริญเติบโตของเซลล์บริเวณที่ติดเชื้อในลักษณะเดียวกับที่พบในเซลเนื้องอก(tumor cell) และตรวจพบว่าเนื้อเยื่อพืชสามารถสังเคราะห์สารโอพีน ซึ่งเป็นสารที่พบในเซลล์ crown gall

Raineri *et al.* (1990) ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวจาโปนิกาโดย *A. tumefaciens* Gould *et al.* (1991) ส่งถ่ายยีนที่ต้านทานต่อกานามัยซิน (NPTII) และ β-glucuronidase (*gus*) สู่ข้าวโพด (*Zea may*) โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA1 pGUS3 และสามารถชักนำให้เกิดต้นข้าวโพดที่ต้านทานต่อกานามัยซินได้ 25 ต้น Chan *et al.* (1992) ส่งถ่ายยีน *gus* และ neomycin phosphotransferase(NPTII) สู่ข้าวอินดิกาด้วยวิธีการเดียวกัน และสามารถชักนำแคลลัสที่เจริญจากรากที่ได้รับการส่งถ่ายยีนให้เจริญเป็นต้นได้ 37.5% Chan *et al.* (1993) ประสบความสำเร็จในการสร้างข้าวจาโปนิกาแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ geneticin (G418) ได้ 4 ต้น โดยนำเอ็มบริโอที่ยังไม่เจริญเต็มวัย (immature embryo) ของข้าวบ่มรวมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A281 และตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* และ NPT*II* ในข้าวรุ่น R1 และ R2 Dong *et al.* (1996) ส่งถ่ายยีนสู่ข้าวจาวานิกา

พันธุ์ Gulfmont และ Jefferson โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404:pTOK233 และ EHA105:pIG121hm โดยพวกเขาสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นข้าวที่ต้านทานต่อไฮโกร-มัยซินและตรวจพบการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายในข้าวรุ่น R1 และ R2 Park *et al.* (1996) ส่งถ่ายยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช phosphinotricin (PPT) สู่ปลายยอดของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Maybelle โดย *A. tumefaciens* EHA101 และสามารถสร้างต้นข้าวที่ต้านทานต่อ PPT ได้ Nishizawa *et al.* (1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *Chi2* หรือ *Chi3* ที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ chitinase เข้าสู่ ข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Nipponbare และ Koshihikari โดย *A. tumefaciens* ผลการศึกษาสามารถสร้างข้าวแปลงพันธุ์มีความทนทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Magnaporthe grisea* ได้มากกว่าต้นข้าวปกติ และลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ Yara *et al.* (2001) รายงานการส่งถ่ายยีน *luc* ในข้าวพันธุ์ Taichung 65 และ Notohikari โดย *A. tumefaciens* และพบมีการแสดงออกของยีน *luc* ในข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_0 และ T_1 นอกจากนี้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแคลลัสก่อนนำแคลลัสมาบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* ไม่มีผลใด ๆต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน Lucca *et al.* (2001) ศึกษาการสร้างต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่สามารถดูดธาตุเหล็กได้มากกว่าต้นข้าวปกติโดยส่งถ่ายยีนที่มีรหัสสังเคราะห์ ferritin ที่โคลนได้จาก *Phaseolus vulgaris* และยีนที่มีรหัสสังเคราะห์ cysteine เข้าสู่ข้าวพันธุ์จาโปนิกาพันธุ์ โดย *A. tumefaciens* และพบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนที่มีรหัสสังเคราะห์ ferritin สามารถดูดธาตุเหล็กได้มากกว่าต้นข้าวปกติ 2 เท่า ส่วนต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนที่มีรหัสสังเคราะห์ cysteine และ ferritin ดูดธาตุเหล็กได้มากกว่าต้นข้าวปกติเช่นกัน Hoa *et al.* (2003) รายงานการส่งถ่ายยีน *psy* ที่มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ phytoene synthase ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Gt1* เข้าสู่ข้าวอินดิกาพันธุ์ IR64 และ MTL250 และข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Taipei309 โดย *A. tumefaciens* pCAMBIA1200 ผลการศึกษาพบการแสดง-ออกของยีนแปลกปลอมในเมล็ดข้าวและทำให้เมล็ดข้าวมีปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงกว่าเมล็ดข้าวปกติ โดยเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_1 มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 0.1-0.9 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำ-หนักสด Horvath *et al.* (2003) ประสบความสำเร็จในการสร้างข้าวสาลีแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia gramnis* ได้ด้วยการส่งถ่ายยีน *rpg1* เข้าสู่คัพภะอ่อนของข้าวสาลีพันธุ์ Golden Promise โดยใช้ *A. tumefaciens* H228 ผลการศึกษาพบว่าข้าวสาลีแปลงพันธุ์มีความต้านทานต่อโรคราสนิมได้ในระดับสูงกว่าพืชปกติ

ปัจจัยส่งเสริมการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*

Schafer *et al.* (1987) รายงานการกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* (*vir* region) บน Ti plasmid ได้ด้วยสารที่หลั่งจากบาดแผลของพืชใบเลี้ยงคู่ และจากการใช้สารชนิดนี้ทำให้สามารถชักนำการสร้าง crown gall tumor ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดย *A. tumefaciens* ได้ การลอกรหัสของยีน *vir* ถูกชักนำได้ด้วยสารประกอบฟีนอลหลายชนิด เช่น acetosyringone และ alpha-

hydroxyacetosyringone ซึ่งปลดปล่อยออกจากบาดแผลของพืช และจากการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่านอกจาก acetosyringone แล้วยังมี phenolic compounds ชนิดอื่นที่สามารถกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ได้ เช่น coniferyl alcohol และ sinapinic acid (Hooykass and Schilperoot, 1992) และการบ่มเซลล์พืชหรือเนื้อเยื่อพืชที่มีบาดแผลร่วมกับ *A. tumefaciens* บนอาหารที่มี acetosyringone เป็นองค์ประกอบสามารถชักนำให้ยีน *vir* มี การทำงานแบบ *in vitro* ได้ Godwin *et al.* (1991) ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของ acetosyringone และ pH ของอาหารที่มีต่อการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ผลการศึกษาพบว่า acetosyringone สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการก่อโรคของ *A. tumefaciens* ได้ James *et al.* (1993) รายงานการเติม acetosyringone ร่วมกับสาร osmoprotectant เช่น betain phosphate หรือโพรลีนในอาหารที่ใช้สำหรับบ่มเนื้อเยื่อพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* เพื่อเพิ่มกิจกรรมของยีน *gus* ในต้นแอปเปิลแปลงพันธุ์ ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลส่งเสริมประสิทธิภาพของการกระตุ้นยีนได้แก่ การบ่ม *A. tumefaciens* ในอาหารที่มี pH ต่ำกว่า 5.7 และอุณหภูมิต่ำกว่า 30°ซ. (Stachel *et al.*, 1985) และการบ่ม *A. tumefaciens* ใน potato suspension culture (PSC) ก่อนนำมาบ่มร่วมกับเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในข้าวอินดิกา (Gould *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 1992) และข้าวจาโปนิกา (Chan *et al.*, 1993) ได้ Li *et al.* (1992) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *gus* ในข้าวแปลงพันธุ์ และเสนอว่าสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่แตกต่างกันมีผลต่อการแสดงออกของยีน *gus* ในข้าวได้แตกต่างกัน และเสนอว่าการเพิ่มจำนวนสำเนาของยีน *virG* ในพลาสมิดของ *A. tumefaciens* ชนิด agropine ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน *gus* ในข้าวแปลงพันธุ์และผักชีฝรั่งแปลงพันธุ์ได้ ดีเอนเอในเซลล์พืชสามารถเกิด cytosine methylation ได้ในอัตราสูง ซึ่งรวมถึงยีนที่ก่อให้เกิดโรคปุ่มปมที่พืชได้รับจาก *A. tumefaciens* ด้วย (Palmgren *et al.*, 1993) เนื่องจากเบส cytosine ในบริเวณโปรโมเตอร์มักถูกเติมหมู่เมทิล ดังนั้นการแสดงออกบางส่วนหรือทั้งหมดของยีนแปลกปลอมและยีนเจ้าบ้านอาจถูกยับยั้ง (Mandal *et al.*, 1994) Mandal *et al.* (1993) และ Mandal *et al.* (1994) รายงานการใช้ 5′-azacytidine (azaC) ซึ่งเป็นสาร demethylation agent เพิ่มประสิทธิภาพการสร้าง *Arabidopsis thaliana* แปลงพันธุ์ได้ และพบว่า azaC เพิ่มการเจริญเป็นต้นของ *Arabidopsis* ได้ 3-96% Uze *et al.* (1997) รายงานการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Taipei309 โดยนำคัพภะข้าวเลี้ยงบนที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% และ 10% เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์พืชเกิดพลาสโมไลซิส ก่อนนำไปยิงด้วยกระสุนทองคำเพื่อให้คัพภะเกิดบาดแผล จากนั้นนำคัพภะดังกล่าวไปบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* ผลการศึกษาพบว่าคัพภะข้าวมีการแสดงออกของยีน *gus* เพิ่มขึ้น Salas *et al.* (2001) ศึกษาเปรียบเทียบการบ่มเนื้อเยื่อยาสูบร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 15, 19, 25 และ 32°ซ. ผลการศึกษาพบว่าการส่งถ่ายยีนมีประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อบ่มเนื้อเยื่อพืชยาสูบร่วมกับ *A. tumefaciens* ที่อุณหภูมิ 19°ซ. ส่วนที่อุณหภูมิ 25°ซ. เซลล์พืชมีภูมิไวรับ

(susceptibility) ต่อ *A. tumefaciens* ได้ดีและทำให้การแทรกของ T-DNA ในจีโนมพืชมีความเสถียรกว่าที่อุณหภูมิอื่น แต่ไม่พบมีการส่งถ่ายยีนที่อุณหภูมิ 32°ซ. การศึกษานี้แตกต่างจากการทดลองของ Dillen *et al.*(1997) ซึ่งรายงานว่าการบ่มเนื้อเยื่อพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* ที่อุณหภูมิ 19°ซ. และ 22°ซ. ไม่ทำให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนแตกต่างกัน แต่การบ่มเนื้อเยื่อพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ทำให้การแสดงออกของยีน *gus* ลดลง Enriquez-Obregon *et al.* (1999) รายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติมสาร antinecrotic เช่น ascorbic acid, cysteine และ silver nitrate ก่อนและหลังการ co-cultivation เพื่อลดการตายของแคลลัสเช่นเดียวกับ Frame *et al.*(2002) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวโพดในอาหารที่เติม cysteine ความเข้มข้น 400 มก./ล. ก่อนการ co-cultivation ร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA101 ทำให้คัพภะมีการแสดงออกของยีน *gus* 56% และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเท่ากับ 5.5% ส่วนคัพภะที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cysteine มีการแสดงออกของยีน *gus* 15% และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเท่ากับ 0.2% และต้นข้าวโพดแปลงพันธุ์สามารถถ่ายทอดการแสดงออกของยีนคัดเลือกและยีนรายงานผลไปสู่รุ่น T_1, T_2 และ T_3 ได้ Cornejo *et al.* (1993) รายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อทำให้พืชเกิดความเครียด (thermal stress) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน *gus* ในพืชแปลงพันธุ์ได้ Ke *et al.*(2001) รายงานการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ต้นถั่วและแคลลัสข้าวโดย *A. tumefaciens* pAD1339 พลาสมิด pAD1339 ประกอบด้วยยีน *virG* ที่มีการแสดงออกสูงและมีการแสดงออกตลอดเวลาโดยไม่จำเป็นต้องได้รับการชักนำ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในพืชแปลงพันธุ์พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* สูงมากกว่าการใช้พลาสมิดปกติ 2-7 เท่า

การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยวิธีตรง

1. **การส่งถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG)**

คือการนำโพรโทพลาสต์บ่มในสารละลายดีเอนเอและ polyethylene glycol (PEG) PEG มีคุณสมบัติชักนำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์จึงกระตุ้นให้เกิดการรับดีเอนเอเข้าสู่เซลล์พืชได้ Hayashimoto *et al.* (1990) สร้างข้าวพันธุ์ Nipponbare และพันธุ์ Taipei309 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน โดยบ่มโพรโทพลาสต์ข้าวร่วมกับพลาสมิด pLG90 ที่มียีน *hpt* เป็นยีนเครื่องหมาย ในสารละลาย PEG ความเข้มข้น 20%(w/v) เป็นเวลา 10 นาที และสามารถชักนำโพรโทพลาสต์ข้าวพันธุ์ Nipponbare และพันธุ์ Taipei 309 ให้เจริญเป็นต้นข้าวที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินได้ 4 ต้นและ 39 ต้นตามลำดับ Datta *et al.* (1992a) รายงานว่าสามารถสร้างข้าวอินดิกาพันธุ์ IR72 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อ PPT และไฮโกรมัยซินโดยบ่มโพรโทพลาสต์ข้าวร่วมกับพลาสมิด pShi943 ในสารละลาย PEG ความเข้มข้น 40% (w/v) ที่อุณหภูมิ 20°ซ. เป็นเวลา 10 นาที และสามารถชักนำโพรโทพลาสต์ให้เกิดต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อ PPT และไฮโกรมัยซินได้ 170 และ 92 ต้นตามลำดับ Stark-Lorenzen *et al.*(1997) รายงานการส่งถ่าย

ยีน *vst1* ที่มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ stilbene synthase เข้าสู่ข้าวโดยใช้เทคนิคนี้ โดยนำโพรโทพลาสต์บ่มรวมกับพลาสมิดในสารละลาย PEG เข้มข้น 40%(w/v) เป็นเวลา 15 นาที ผลการศึกษาพบว่าข้าวแปลงพันธุ์ในรุ่นที่ T_0 ถึง T_2 มีความทนทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* แต่เมล็ดข้าวในรุ่นลูกส่วนใหญ่ไม่สมบูรณ์พอจะเจริญเป็นต้นใหม่ได้

2. การส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation)

คือการนำโพรโทพลาสต์บ่มรวมกับสารละลายดีเอนเอ แล้วใช้กระแสไฟฟ้าชักนำให้เกิดช่องว่างขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โมเลกุลดีเอนเอสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โพรโทพลาสต์จะถูกบ่มอยู่ระหว่างอิเล็กโทรดในสารละลายอิออนิกที่มีดีเอนเอ และนิยมใช้สารละลาย PEG ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ การแสดงออกของยีนที่ถูกส่งเข้าสู่เซลล์พืชขึ้นอยู่กับความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า, ค่าเก็บประจุ(capacitance), จำนวนพลาสมิดและดีเอนเอ และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม (Rathore *et al.*, 1993) ปัญหาสำคัญของการส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ได้แก่ขั้นตอนการแยกโพรโทพลาสต์และการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ให้เจริญเป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโพรโทพลาสต์ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว Chaudhury *et al.* (1995) ชักนำพลาสมิดที่มียีน *gus* และ CaMV 35S promotor เข้าสู่คัพภะของข้าวอินดิกาได้ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 1,600 โวลล์/เซนติเมตร และค่าเก็บประจุ 100 ไมโครฟารัด เป็นเวลา 0.075 วินาที และตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* ในใบ ลำต้น และรากของต้นกล้าที่เจริญจากคัพภะได้ Rao (1995) ใช้เทคนิคนี้ในการส่งถ่ายพลาสมิด pAG35bar ที่มีโปรโมเตอร์ CaMV35S โปรโมเตอร์ actin ยีน *bar* และ *gus*A เข้าสู่คัพภะอ่อนของข้าวโดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 90 โวลล์/เซนติเมตร และค่าเก็บประจุ 960 ไมโครฟารัด Hoshida *et al.*(2000) ส่งถ่ายยีนที่มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ chloroplastic glutamine synthetase (GS) เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kinuhikari โดยเทคนิคนี้โดยต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่มีปริมาณเอนไซม์ GS สูงกว่าพืชปกติมีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงทนต่อความหนาวเย็นและสภาพดินเค็มมากกว่าพืชปกติ

3. การส่งถ่ายยีนโดยวิธียิงกระสุน (Particle bombardment)

คือเทคนิคที่นำดีเอนเอเคลือบบนกระสุนทังสเตนหรือกระสุนทองคำขนาดเล็ก แล้วยิงกระสุนให้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงสู่เซลล์พืช ทำให้ดีเอนเอเข้าสู่นิวเคลียสของพืชได้ โดยทั่วไปกระสุนที่ใช้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-4 μm และเคลื่อนที่สู่เซลล์ด้วยการระเบิดประจุหรือการใช้คลื่นกระแทก (shock wave) ที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูง เทคนิคนี้สามารถปฏิบัติกับเนื้อเยื่อพืชได้โดยตรง Yuan *et al.*(2002) ส่งถ่ายยีน *tcs* ซึ่งมีรหัสสำหรับการสร้าง trichosanthin เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Zhonghua 8 โดยวิธียิงกระสุน จากการทดสอบความทนทานต่อโรคพบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_1 และ T_2 สามารถทนทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ได้ Bidney *et al.* (1992) รายงานว่าการนำเนื้อเยื่อใบยาสูบไปยิง

ด้วยกระสุนทังสเตนเพื่อให้เกิดบาดแผลก่อนนำไปบ่มรวมกับ *A. tumefaciens* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ได้ และการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีนี้สามารถสร้างต้นยาสูบที่ต้านทานต่อกานามัยซินได้มากกว่าวิธียิงกระสุนแบบปกติ Biswa *et al.*(1998) ศึกษาการสร้างข้าวแปลงพันธุ์ด้วยการยิงแคลลัสข้าวด้วยกระสุนทองคำที่เคลือบด้วยพลาสมิด pGH ที่มียีนต้านทานต่อไฮโกรมัยซินและยีน *gus* เป็นยีนคัดเลือกและยีนรายงานผลตามลำดับ และพบว่าการยิงแคลลัสน้ำหนัก 1.5 กรัมต่อครั้ง ทำให้สามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินได้ 4.6 แคลลัส และเพาะเลี้ยงแคลลัสนั้นให้เจริญเป็นต้นข้าวแปลงพันธุ์ได้ Breitler *et al.*(2002) ศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยวิธีนี้ในแคลลัสข้าวพันธุ์ Taipei 309 และ Nipponbare โดยเปรียบเทียบโครงสร้างของยีนที่ใช้ยิงเข้าสู่แคลลัส ได้แก่ พลาสมิดดีเอนเอ และชุดของยีน (gene cassette DNA) ผลการศึกษาพบว่าการยิงกระสุนที่เคลือบด้วยชุดของยีนเข้าสู่แคลลัสมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนไม่แตกต่างจากกระสุนที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอนเอ Pellegrineschi *et al.*(2002) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในคัพภะและเนื้อเยื่อ scutellum ข้าวสาลีพันธุ์ Durum ด้วยการทำให้ต้นข้าวสาลีเกิดความเครียดจากการขาดน้ำและความร้อนสูงเป็นเวลา 1 วัน ก่อนนำไปส่งถ่ายยีนโดยวิธียิงกระสุน และเสนอว่าจีโนไทป์และสภาวะทางสรีรวิทยาของพืชมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน Alfonso-Rubi *et al.*(1999) ศึกษาระยะห่างที่เหมาะสมสำหรับการยิงแคลลัสด้วยกระสุนที่เคลือบด้วยยีน *gus* และรายงานว่าระยะห่างระหว่าง stopping plate และแคลลัสข้าวที่ระยะ 6 ซม. และ 9 ซม. ทำให้แคลลัสมีการแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด และการทำให้แคลลัสได้รับสารที่มีค่าศักย์ออสโมซิสสูง (เช่น แมนนิทอลความเข้มข้น 0.4 M) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำแคลลัสนั้นไปส่งถ่ายยีนด้วยการยิงกระสุน และให้แคลลัสได้รับสารนี้อีกครั้งหลังจากการยิงอีก 16 ชั่วโมง ทำให้แคลลัสมีการแสดงออกของยีน *gus* เพิ่มขึ้น แต่พบว่าแคลลัสเหล่านั้นมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นใหม่ลดลง Nandadeva *et al.*(1999) รายงานการนำเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ Taipei309 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสาร osmoticum ชนิดต่าง ๆ เช่น ซูโครส มอลโทส ซอบิทอล และแมนนิทอล เพื่อให้เซลเกิดพลาสโมไลซิสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงก่อนนำไปส่งถ่ายยีนด้วยวิธียิงกระสุน พบว่าวิธีนี้ทำให้เซลล์มีโอกาสรอดชีวิตจากคลื่นกระแทกที่เกิดขึ้นระหว่างการยิง และแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมแมนนิทอลมีการแสดงออกของยีน *gus* ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ความร้อนแก่พลาสมิดที่อุณหภูมิ 95°ซ. เพื่อให้พลาสมิดเกิด denaturation ก่อนนำไปยิงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนได้ 2.6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมิดที่ไม่ได้ให้ความร้อน Ingram *et al.*(1999) ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่คัพภะที่เจริญจากละอองเรณูของข้าวสาลีพันธุ์ Pavon ด้วยวิธียิงกระสุนทองคำที่เคลือบด้วยพลาสมิด AHC25 (มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล) และรายงานว่าคัพภะมีการแสดงออกของยีน *gus* สูงที่สุด เมื่อมีระยะห่างในการยิง 70 มม. แรงดัน 1300 psi. และใช้กระสุนทองคำน้ำหนัก 200 μg เคลือบด้วยพลาสมิด 0.5 μg ต่อการยิงหนึ่งครั้ง นอกจากนี้ยังรายงานว่าการเพาะเลี้ยงคัพภะในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโทสความเข้มข้น 0.4 M เป็นเวลา

4 ชั่วโมงก่อนนำไปยิง ทำให้คัพภะมีการแสดงออกของยีน *gus* มากกว่าคัพภะที่ไม่ได้เลี้ยงบนอาหารที่เติมมอลโทส 3 เท่า

ยีนรายงานผล (reporter gene)

คือยีนที่ใช้เป็นเครื่องยืนยันให้ทราบว่ายีนแปลกปลอมได้เข้าสู่เซลล์พืช และมีการแสดงออกได้จริงภายหลังการส่งถ่ายยีนสู่เซลล์พืชแล้ว การใช้ยีนรายงานผลช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการพิจารณาเป็นอย่างมาก และทำให้ขั้นตอนการส่งถ่ายยีนรวดเร็วขึ้น ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

1. **Beta-glucuronidase (*gus*) gene**

Jefferson *et al.* (1986) สามารถโคลนยีน beta-glucuronidase(*gus*)ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ beta-glucuronidase (*gus*) จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* มาประยุกต์ใช้เป็นยีนรายงานผลในพืชชั้นสูงได้สำเร็จ ซึ่งต่อมาได้เป็นที่ยอมรับและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย การตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *gus* สามารถทำได้โดยนำเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการทดสอบแช่ในสารละลายสับสเตรท X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D-glucoronides) เอนไซม์ GUS จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสับสเตรทให้เป็นสาร 5-bromo-4-chloro-indico ซึ่งเป็นสารอินโดลิล (indoyl derivative) ที่มีสีฟ้า Jefferson *et al.* (1987) ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษากิจกรรมของ intrinsic GUS ในราก ลำต้น และใบของพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ยาสูบ มะเขือเทศ มันฝรั่ง *Brassica napus* และ *Arabidopsis thaliana* รวมทั้งหัวมัน-ฝรั่ง เมล็ดข้าวสาลีและเมล็ดยาสูบโดยวิธี fluorescence assay และพบว่าเนื้อเยื่อพืชทุกชนิดมีกิจกรรมของ endogenous GUS ในปริมาณต่ำเกินกว่าจะตรวจพบได้ Hu *et al.* (1990) ตรวจพบกิจกรรมของ intrinsic GUS ในพืชเมล็ดเปลือย (gymnospermy) และพืชดอก (angiospermy) จำนวน 52 ชนิด ด้วยวิธี histochemical assay, fluorometric assays และ ELISA GUS assay แต่ไม่พบมีกิจกรรมของ intrinsic GUS ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Jefferson *et al.* (1987) และเสนอว่าการใช้ยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลที่มีความน่าเชื่อถือ Li *et al.* (1992) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสข้าว และพบว่าการเติม 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดยับยั้งการแสดงออกของยีน *gus* แต่การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 6 มก./ล. สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีน *gus* ในพืชแปลงพันธุ์ได้เล็กน้อย

2. **Chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene**

คือยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) โคลนจากแบคทีเรีย *E. coli* และนิยมใช้เป็นยีนรายงานผลสำหรับการส่งถ่ายยีนสู่พืช การตรวจสอบเอนไซม์ CAT ในพืชแปลงพันธุ์กระทำได้ง่ายและน่าเชื่อถือ เนื่องจากไม่พบมีกิจกรรมของเอนไซม์

นี้ในพืช วิธีการตรวจสอบโดยทั่วไปนิยมบ่มเอนไซม์ CAT ร่วมกับ chloramphenicol และ acetyl coenzyme A ที่ติดฉลากด้วย ^{14}C เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา acetylation แล้วแยก acetylated chloramphenicol ออกภายหลังด้วยเทคนิค thin layer chromatography

3. **Luciferase (*luc*) gene**

คือยีนเรืองแสงที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ luciferase พบในหิ่งห้อย (*Photinus pyralis*) และ bioluminescent bacteria (*Vibrio haveyii* และ *V. fischeri*) นำมาประยุกต์ใช้เป็นยีนรายงานผลที่มีประสิทธิภาพสูงในแบคทีเรีย พืช และสัตว์ เอนไซม์ luciferase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา ATP-dependent oxidation ของ luciferin ทำให้เกิดการเรืองแสงซึ่งสามารถมองเห็นได้โดยตรงด้วยตา Baruah-Wolff *et al.*(1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ TN1 ด้วยวิธียิงกระสุนเข้าสู่เนื้อเยื่อ scutella ของคัพภะอ่อน โดยมียีน *luc* และ *hpt* เป็น ยีนรายงานผลและยีนคัดเลือกตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากแคลลัสและส่วนต่าง ๆจากต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่นลูกมีการเรืองแสงเมื่อได้รับ luciferin Yara *et al.*(2001) รายงานการส่งถ่ายยีนในข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Taichung 65 โดย *A. tumefaciens* EHA101 ที่มียีน *luc* เป็น ยีนรายงานผลและ CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ และพบว่าข้าวแปลงพันธุ์ในรุ่น T_1 มีการแสดงออกของยีน *luc* 60%

4. **Green fluorescent protein (GFP)**

คือยีนกำหนดการสร้างโปรตีนเรืองแสง โคลนได้จากแมงกะพรุน (*Aequorea victoria*) ปัจจุบันนำมาประยุกต์ใช้เป็นยีนรายงานผลแทนยีน *gus* เนื่องจากเป็นยีนรายงานผลที่ไม่มีผลเสียต่อการเจริญของพืช และสามารถมองเห็นการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อพืชได้ด้วยตาเปล่าเมื่อนำเนื้อเยื่อพืชไปวางภายใต้แสงยูวี จึงสามารถนำมาเป็นยีนคัดเลือกแทนยีนต้านทานต่อสาร-ปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชได้ (Stewart, 2001) มีรายงานการนำยีน GPF มาใช้เป็นยีนรายงานผลในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี (McCormac et al., 1998), ส้มเกลี้ยง (*Citrus aurantium*) (Ghorhel and Juarez, 1999) และถั่วลิสง (Ponappa *et al.*, 2000) Vain *et al.*(2000) ประสบความสำเร็จในการใช้ยีน GPF เป็นยีนรายงานผลในส่งถ่ายยีนสู่ข้าวโดย *A. tumefaciens* และรายงานว่าการนำยีน GPF มาใช้เป็นยีนรายงานผลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในข้าวได้

ยีนคัดเลือก (selectable marker)

คือ ยีนที่ใช้ในการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ (transformant) ออกจากพืชปกติ (untransformant) หลักการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์คือ ยับยั้งการเจริญของพืชปกติโดยไม่ทำให้เกิดอันตรายใด ๆ แก่พืชแปลงพันธุ์ (Vasil, 1994)

1. **Negative marker**

1.1 ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่นิยมนำมาเป็นยีนคัดเลือกสำหรับการส่งถ่ายยีนสู่ข้าว ได้แก่ ยีน *aph*A2 โคลนจาก transposon Tn5 ที่พบใน *E. coli* ยีน *aph*A2 มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferaseII (NPTII) หรือ aminoglycoside-3′-phosphotranferaseII(APH(3′)II) (Herrera-Estrella *et al.*, 1999) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารปฏิชีวนะประเภทอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) สารปฏิชีวนะประเภทนี้สามารถจับกับ 30S subunit ของไรโบโซมในโปรคาริโอตทำให้เซลล์ไม่สามารถแปลรหัสเพื่อการสร้างโปรตีน ส่วนในเซลล์พืชอะมิโนไกลโคไซด์มีฤทธิ์ต่อไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ โดยยับยั้งการสร้างโปรตีนเช่นเดียวกับที่พบในโปรคาริโอต พืชจะแสดงอาการใบเหลืองซีดเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ได้ และตายในที่สุด เอนไซม์ NPTII ยับยั้งการทำงานของสารปฏิชีวนะประเภทนี้ได้ด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) ของสารปฏิชีวนะอะมิโนไกลโคไซด์ที่นิยมใช้เป็นสารคัดเลือก (selective agent) มีหลายชนิดได้แก่ กานามัยซิน(kanamycin), neomycin, G418 และ พาราโนมัยซิน (paranomycin)

รายงานการทดลองจำนวนมากเห็นตรงกันว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดรวมทั้งข้าวมีความต้านทานตามธรรมชาติต่อกานามัยซิน Hauptmann *et al.* (1988) ศึกษาพบว่าพืชในวงศ์ Gramineae หลายชนิด เช่น ข้าวสาลี และหญ้ากินนี (*Panicum*) มีความต้านทานตามธรรมชาติต่อกานามัยซินในปริมาณสูงถึง 800 มก./ล. ดังนั้นกานามัยซินจึงไม่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสารคัดเลือก(selecting agent) สำหรับแคลลัสข้าว Dekeyser *et al.* (1989) รายงานผลการทดลองที่สนับสนุนการศึกษาของ Hauptmann *et al.* (1988) โดยรายงานว่าแคลลัสของข้าวสาลีสามารถเจริญบนอาหารที่เติมกานามัยซินในปริมาณสูงถึง 500 มก./ล. ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดลองที่ประสบความสำเร็จในการใช้กานามัยซินเป็นสารคัดเลือกสำหรับการ-ส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าวโพด (Gould *et al.*, 1991; Lyznik *et al.*, 1989), ข้าวสาลี (Hauptmann *et al.*, 1988) และข้าว (Dekeyser *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1992) Libiakova *et al.*(2001) รายงานการนำยีน *nptII* เชื่อมต่อกับ intron2 จากยีน ST-LS1 ที่โคลนได้จากมันฝรั่งมาใช้เป็นยีนคัดเลือกในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่มันฝรั่งและยาสูบโดย *A. tumefaciens* เพื่อทำให้ยีน *nptII* มีการแสดงออกเฉพาะในยูคาริโอตเท่านั้น และเสนอว่ายีนคัดเลือกดังกล่าวมีประสิทธิภาพสำหรับการส่งถ่ายยีน

ยีน *hptII* โคลนได้จาก *E. coli* มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (HPT) หรือ aminoglycoside 4′- phosphotransferase (APH(4′)) มีฤทธิ์ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินบี (hygromycin B) ในโปรคาริโอตไฮโกรมัยซินจะเกาะกับ binding site ของ elongation factor 2 (EF-2) เพื่อยับยั้ง peptide chain elongation ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ เอนไซม์ HPT มีกลไกต้านทานต่อไฮโกรไมซินด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้แก่หมู่ไฮดรอกซิลของไฮโกรมัยซิน มีรายงานการคัดเลือกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวแปลงพันธุ์หลายชนิดโดยใช้ไฮโกรมัยซิน เช่น ข้าวสาลี (Hauptmann *et al.*, 1988), ข้าว (Dekeyser *et al.*, 1989; Shimamoto *et al.*, 1989; Tu *et al.*, 2000) และข้าวโพด (Hayashimoto *et al.*, 1990) นอกจากจะใช้คุณสมบัติต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ออกจากพืชปกติแล้ว อาจคัดเลือกโดยตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นผลผลิตของยีนเครื่องหมายในพืชแปลงพันธุ์ได้อีกด้วย (Sporlein, 1991)

1.2 ยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช

ยีน *bar* และยีน *pat* เป็นยีนที่โคลนได้จาก *Streptomyces hygroscopicus* และ *S. viridochromogene* ตามลำดับ มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ phosphinitricin-N-acetyltransferase (PAT) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชที่มี phosphinitricin(PPT) เป็นสารออกฤทธิ์ ชื่อทางการค้าของสารกำจัดวัชพืชที่มี PTT เป็นสารออกฤทธิ์มีหลายชนิดได้แก่ ได้แก่ Basta, Liberty และ Herbiace PTT มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับซับสเตรตของเอนไซม์ glutamate synthetase (GS) จึงเป็นสารยับยั้งแบบแข่งขัน(competitive inhibitor) ไปยับยั้งการทำงานของ GS ในการเปลี่ยนกลูตาเมตไปเป็นกลูตามีน ทำให้ระดับแอมโมเนียในเซลล์พืชเพิ่มขึ้น การสังเคราะห์แสงหยุดชะงักและส่งผลให้เซลล์พืชตาย เอนไซม์ PAT ยับยั้งฤทธิ์ของ PTT ได้ด้วยการเติมหมู่อะเซทิลให้แก่ PTT มีรายงานการนำยีน *bar* มาใช้เป็นยีนคัดเลือกสำหรับการส่งถ่ายยีนในข้าวและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด (Vasil, 1994) Harvey *et al.*(1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีนในข้าวสาลีพันธุ์ Bob White โดยวิธียิงกระสุน โดยมียีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก และรายงานการคัดเลือกแคลลัสข้าวสาลีแปลงพันธุ์ออกจากแคลลัสปกติได้บนอาหารที่เติม PTT ความเข้มข้น 3 มก./ล.

2. Positive marker

การคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์โดยใช้ยีนเครื่องหมายที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชอาจยับยั้งการเจริญเติบโต และพัฒนาการของเนื้อเยื่อพืชแปลงพันธุ์ที่มีความเปราะบาง เช่น โปรโตคอร์ม(protocorm)กล้วยไม้ (Chia *et al.*, 1994) นอกจากนี้พืชแปลงพันธุ์ที่ใกล้ตายจะปล่อยสารบางอย่างที่ยับยั้งการดูดอาหารของพืชแปลงพันธุ์ต้นอื่น และมีผลเสียต่อการเจริญของพืชแปลงพันธุ์ต้นอื่นด้วย (Ebinuma *et al.*, 2001) positive marker ที่

นิยมใช้ในการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ ได้แก่ ยีน *man* หรือ ยีน *pmi* โคลนได้จาก *E. coli* มีรหัสกำหนดการสร้าง phosphomannose isomerase (PMI) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน manose-6-phosphate ให้เป็น fructose-6-phosphate และไม่พบมียีนนี้ในพืชปกติ พืชแปลง-พันธุ์ที่มียีน *man* เป็นยีนคัดเลือกจะสามารถเจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนโนสได้ แต่พืชปกติไม่สามารถใช้น้ำตาลแมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ จึงทำให้การเจริญหยุดชะงัก Negrotto *et al.*(2000) รายงานการส่งถ่ายยีน *pmi* เข้าสู่ข้าวโพดโดย *A. tumefaciens* และคัดเลือกข้าวโพดแปลงพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ PMI ได้บนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนโนสแต่พืชปกติตายเมื่อเลี้ยงบนอาหารชนิดเดียวกัน Wang *et al.*(2000) รายงานการส่งถ่ายยีน *manA* เข้าสู่ข้าวโพดหวานพันธุ์ Black Mexican โดยวิธีใช้สารเคมี PEG และคัดเลือกข้าวโพดแปลงพันธุ์ออกจากพืชปกติได้บนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนโนสความเข้มข้น 20 ก./ล. และพบว่ามีการถ่ายทอดยีน *man*A ไปสู่ข้าวโพดแปลงพันธุ์รุ่น T_1 และ T_2 ได้

การนำยีนเครื่องหมายออกจากพืชแปลงพันธุ์

ความวิตกกังวลในความปลอดภัยจากการนำยีนที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายในพืชแปลงพันธุ์ ส่งผลให้เกิดแนวคิดในการนำยีนเครื่องหมายออกจากพืชแปลงพันธุ์ภายหลังการส่งถ่ายยีนแล้ว นอกจากนี้ความต้องการพืชแปลงพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษหลาย ๆอย่างรวมอยู่ภายในต้นเดียวกันทำให้มีส่งถ่ายยีนมากกว่าหนึ่งชนิดเข้าสู่พืช แต่เนื่องจากปัจจุบันยีนเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่นิยมใช้มีจำนวนน้อย ทำให้มีการใช้ยีนเครื่องหมายที่ซ้ำซ้อนกัน (gene stacking) ก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนการคัดเลือกพืชแปลง-พันธุ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการนำยีนเครื่องหมายออกจากพืชแปลงพันธุ์ โดยยีนที่สนใจยังคงอยู่ ปัจจุบันการนำเครื่องหมายออกจากพืชแปลงพันธุ์มีหลายวิธี ได้แก่

1. วิธี Co-transformation

เป็นการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* และให้ยีนคัดเลือกและยีนที่สนใจแยกอยู่ในต่างพลาสมิดกัน โดยพลาสมิดทั้งสองนี้อาจอยู่ใน *A. tumefaciens* เดียวกันหรือต่างกันก็ได้ และพืชแปลงพันธุ์ต้องมียีนคัดเลือกและยีนที่สนใจแทรกอยู่ในจีโนมพืชบนโลคัสที่ต่างกัน (unlinked loci) เท่านั้น เมื่อนำพืชแปลงพันธุ์ดังกล่าวมาผสมพันธุ์จะเกิด gene segregation ทำให้สามารถแยกยีนคัดเลือกและยีนที่สนใจออกจากกันได้ในรุ่นลูก

Komari *et al.*(1996) นำแคลลัสยาสูบและแคลลัสข้าวบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 ที่มียีนคัดเลือก (*nptII*) และยีน *gus* แยกอยู่บนต่างพลาสมิดกัน ผลการศึกษาพบมีต้นยาสูบที่ทนทานต่อกานามัยซินและมีการแสดงออกของยีน *gus* 35 และ 14% ตามลำดับ และพบมีต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่ทนทานต่อกานามัยซินและมีการแสดงออกของยีน *gus* 12 และ

22% ตามลำดับ ผลการศึกษาพืชแปลงพันธุ์ในรุ่นลูกพบมีต้นยาสูบและต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *gus* เพียงอย่างเดียว 14 และ 12% ตามลำดับ

2. วิธี Site-specific recombination system

เป็นวิธีที่มีพื้นฐานมาจากกระบวนการ recombination ที่พบในแบคเทอริโอฝาจ P1 ประกอบด้วยปัจจัยที่สำคัญ 2 อย่างคือ เอนไซม์รีคอมบิเนส(Cre) และตำแหน่งจดจำ(*loxP*) วิธีนี้มีการส่งถ่ายยีน 2 ครั้ง โดยครั้งแรกเป็นการส่งยีนที่สนใจและยีนคัดเลือกที่ล้อมรอบด้วยตำแหน่งจดจำ (*loxP*-selectable marker-*loxP*) เข้าสู่พืช ครั้งที่สองเป็นการส่งถ่ายยีน *cre* เข้าสู่พืชแปลงพันธุ์ที่ได้จากการส่งถ่ายยีนครั้งแรก ยีน *cre* มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์รีคอมบิเนสทำหน้าที่ตัดตำแหน่งจดจำ *loxP* ออกไป และตัดยีนคัดเลือกออกไปด้วย ทำให้สามารถคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ที่มีเฉพาะยีนที่สนใจได้ในรุ่นลูก

Dale and Ow (1991) ศึกษาการส่งถ่ายยีนในยาสูบโดย *A. tumefaciens* โดยมียีน *luc* เป็นยีนรายงานผลและยีน *hptII* ที่ล้อมรอบด้วยตำแหน่งจดจำ (*loxP-hptII-loxP*) เป็นยีนคัดเลือก จากนั้นนำยาสูบแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *luc* และยีน *hptII* มาส่งถ่ายด้วยยีน *cre* ที่ต่อกับยีน *nptII* อีกครั้ง ผลการศึกษาพบมีต้นยาสูบแปลงพันธุ์ที่ไม่มีกิจกรรมของยีน *hptII* 90.9% และเมื่อนำยาสูบแปลงพันธุ์เหล่านั้นมาผสมพันธุ์ตัวเอง เพื่อแยกยีน *nptII* และยีน *cre* ออกจากยีน *luc* พบมียาสูบแปลงพันธุ์จำนวน 16% ไม่มีกิจกรรมของ *nptII*

3. วิธี *ipt* type MAT (multi-auto-transformation) vector system

เป็นการนำยีน *ipt* ซึ่งโคลนได้จาก Ti plasmid ของ *A. tumefaciens* มาใช้เป็นยีนคัดเลือก และให้ยีนนี้เชื่อมต่ออยู่กับบริเวณ *Ac* transposable element ยีน *ipt* มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ isopentynyl phosphotransferase (IPT) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ isopentenyl AMP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโทไคนินที่ชักนำการสร้างยอดในพืช ดังนั้นพืชแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *ipt* จะสร้างยอดจำนวนมากทำให้สามารถคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ออกจากพืชปกติได้ด้วยการมองเห็น

Ac transposable element คือชิ้นส่วนดีเอนเอที่สามารถตัดตัวเองออกจากตำแหน่งเดิมแล้วย้ายตัวเองไปแทรกในตำแหน่งอื่นในจีโนมพืชได้ ดังนั้นยีน *ipt* ที่เชื่อมต่อกับ *Ac* transposable element จะถูกตัดออกจากตำแหน่งเดิมด้วย ทำให้สามารถแยกยีนคัดเลือกออกจากพืชแปลงพันธุ์ได้โดยไม่เสียเวลาในขั้นตอนการผสมพันธุ์เพื่อให้เกิด gene segregation ในรุ่นลูก Endo *et al.*(2002) รายงานการส่งถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ Kitaake ด้วยวิธีนี้ ผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อ scutellum ของข้าวที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* จำนวน 25% สามารถเจริญเป็นต้นข้าวที่ปราศจากยีน *ipt* ภายในระยะเวลา 1 เดือน และเสนอว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงและเหมาะสมต่อการนำไปใช้เพื่อผลิตธัญพืชแปลงพันธุ์ที่ปราศจากยีนคัดเลือก

โปรโมเตอร์ (promotor)

คือบริเวณบนดีเอนเอที่ RNA polymerase มาเกาะและชักนำให้เกิดการลอกรหัส(transcription) ได้ ความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนสู่พืชขึ้นอยู่กับระดับการแสดงออกของยีนนั้นในพืชแปลงพันธุ์ โปรโมเตอร์ CaMV35S โคลนได้จากเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคใบด่างขาวในกระหล่ำดอก (cauliflower mosaic virus) เป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงในพืชส่วนใหญ่ จากการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของยีนแปลกปลอมภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S ในธัญพืชน้อยกว่าในพืชใบเลี้ยงคู่มาก Pih *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้โปรโมเตอร์ CaMV35S 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ในการส่งถ่ายยีนสู่คัพภะของข้าวและโพรโทพลาสต์ของใบยาสูบ ผลการทดลองพบว่าโปรโมเตอร์ CaMV35S ชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* ในใบยาสูบมากกว่าในคัพภะข้าว 14 เท่า พวกเขาเสนอว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่สร้างสัญญาณเพื่อชักนำให้เกิดการลอกรหัสของยีนได้แตกต่างกัน Christensen *et al.* (1992) รายงานว่ายีน polyubiquitine (*Ubi1* และ *Ubi2*) จากข้าวโพดมีการแสดงออกได้อย่างต่อเนื่องในต้นอ่อนของข้าวโพดแปลงพันธุ์ที่อุณหภูมิ 25°ซ. นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมียีน *cat* เป็นยีนรายงานผล โปรโมเตอร์ *Ubi1* มีการแสดงออกสูงกว่าโปรโมเตอร์ CaMV 35S 10 เท่า Toki *et al.* (1992) ประสบความสำเร็จในการส่งยีนสู่ข้าวโดยมียีน ubiquitine (*Ubi1*) จากข้าวโพดเป็นโปรโมเตอร์ และมียีน *gus* และยีน *bar* เป็นยีนรายงานผลและยีนเครื่องหมายตามลำดับ Xu *et al.* (1993) รายงานว่าการนำยีน actin (*Act1*) ที่โคลนได้จากข้าวเป็นโปรโมเตอร์ร่วมกับ *pin2- gus* fusion gene สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนแปลกปลอมในข้าวแปลงพันธุ์ได้มากกว่าการใช้โปรโมเตอร์ *pin2* อย่างเดียว และพบว่า *pin2-Act1* intron- *gus* fusion gene มีการแสดงออกได้ดีในข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เล่ย์และข้าวฟ่าง Higo and Higo(1996) นำยีน *cat* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่โคลนได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาใช้เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายสู่ข้าว และรายงานผลการทดลองว่ายีน *cat* เป็นโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในข้าวได้ Vain *et al.* (1996) รายงานว่าการเพิ่ม intron *ubi1* (ubiquitin) ด้าน 5′ untranlated leader สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายสู่ข้าวโพดและ bluegrass ให้มากกว่าปกติ 71 เท่า และ 26 เท่าตามลำดับ Yokoi *et al.* (1997) ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน *gus* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ *Osg6B* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Yamahoushi โดย *A. tumefaciens* โดยข้าวแปลงพันธุ์มีการแสดงออกของยีน *gus* เฉพาะในอับเรณูเท่านั้น Hwang *et al.*(2001) นำโปรโมเตอร์ *Ltd1*(lipid transfer protein) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในคัพภะ ต่อเข้ากับยีน *Chi26*(chitinase) จากข้าวบาร์เล่ย์และยีน *gus* แล้วส่งถ่ายเข้าสู่ข้าว ทำให้พบการแสดงออกของยีน *gus* ในเฉพาะในเนื้อเยื่อคัพภะ และชั้นแอลิวโรน (aluerone layer) ในเมล็ดข้าวเท่านั้น Wu *et al.* (1997) ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน *cryIA* ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *Actin 1* ที่โคลนจากข้าว ทำให้ต้นข้าวแปลงพันธุ์

มีความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช yellow stem borer Hwang *et al.*(2002) รายงานการนำโปรโมเตอร์ *Glb*(rice globulin) มาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ไลโซไซม์ของมนุษย์ (human lysozyme) ในต้นข้าวแปลงพันธุ์ และเสนอว่าโปรโมเตอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเปปไทด์สังเคราะห์ (recombinant protein) ในเมล็ดธัญพืชแปลงพันธุ์

การแสดงออกของยีน (gene expressing)

ดีเอนเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การแสดงออกของยีนจะเกิดขึ้นเมื่อเกิดกระบวนการลอกรหัส (transcription) จากดีเอนเอเป็นอาร์เอนเอ แล้วจึงมีกระบวนการแปลรหัส(translation) จากอาร์เอนเอไปเป็นโปรตีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์สิ่งมีชีวิตแสดงลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆได้ หน่วยย่อยของดีเอนเอและอาร์เอนเอคือนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์(phosphodiester) นิว-คลีโอไทด์มีองค์ประกอบ 3 ส่วน ได้แก่ สารประกอบเบส น้ำตาลไรโบส และหมู่ฟอสเฟต สารประกอบเบสแบ่งได้ 2 ประเภท คือ พิวรีน(purine) และไพริมิดีน(pyrimidine) เบสพิวรีนประกอบด้วยอะดินีน(adenine) และกัวนีน(guanine) ส่วนเบสไพริมิดีนประกอบด้วยไซโต-ซีน(cytosine) ไทมีน(thymine) และยูราซิล(uracil) โดยพบไทมีนเฉพาะในดีเอนเอ และยูราซิลพบเฉพาะในอาร์เอนเอ โครงสร้างดีเอนเอเกิดจากสารโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายเรียงตัวขนานกันและกลับทิศทางกัน โดยเบสของนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ อาร์เอนเอมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ชนิดของอาร์เอนเอได้แก่ ribosomal RNA(rRNA), transfer RNA(tRNA) และ messenger RNA(mRNA) สำหรับโครงสร้างของอาร์เอนเอในเซลล์พืชเป็นสายเดี่ยว โครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงประกอบด้วยดีเอนเอซึ่งอยู่รวมกับโปรตีนฮีสโตน การสังเคราะห์อาร์เอนเอเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase และต้องอาศัยดีเอนเอสายใดสายหนึ่งเป็นต้นแบบ เรียกว่า anticodind strand ส่วนสายที่ไม่ได้เป็นต้นแบบเรียกว่า coding strand นอกจากนี้ยังมีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต 4 ชนิด ได้แก่ ATP, GTP, CTP และ UTP รวมทั้งแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนประกอบในกระบวนการ และการสังเคราะห์อาร์เอนเอเป็นไปในทิศทาง $5'$-$3'$ ตำแหน่งควบคุมการเริ่มต้นลอกรหัสคือโปรโมเตอร์เมื่อเอนไซม์ RNA polymerase เกาะที่โปรโมเตอร์ การลอกรหัสจะเริ่มต้นขึ้นและจะหยุดการทำงานเมื่อพบบริเวณสำหรับหยุด(terminator)

ภายหลังการส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่พืชแล้ว การตรวจสอบพืชแปลงพันธุ์สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นการเทคนิคเพิ่มจำนวนดีเอนเอเฉพาะบริเวณที่ตัดต่อเข้าสู่พืชแปลงพันธุ์เท่านั้น โดยมีดีเอนเอเริ่มต้น(primer) ที่สามารถจับกับดีเอนเอแม่แบบและเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทำให้มีการสังเคราะห์ดีเอนเอสายใหม่ขึ้นได้ และวิเคราะห์ยีนเป้าหมายที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค southern blot hybridization ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้

ดีเอนเอตรวจจับ(probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีนหรือโปรโมเตอร์ที่จับตัวได้เฉพาะกับยีนเป้าหมายเท่านั้น นอกจากการตรวจสอบหายีนแปลกปลอมที่สอดแทรกในจีโนมพืชแล้วยังสามารถตรวจสอบ mRNA ที่สังเคราะห์จากยีนแปลกปลอมได้ด้วยเทคนิค northern blot hybridization แต่ mRNA จะคงอยู่ได้ในระยะเวลาสั้นๆ แต่โปรตีนที่สังเคราะห์จากยีนแปลกปลอมจะคงอยู่ได้นานกว่า ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์โปรตีนของยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค western blot hybridization จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยม Kanzaki *et al.*(2002) รายงานการส่งถ่ายยีนต้านทานต่อเชื้อรา *Magnaporth grisea* ที่เป็นสาเหตุของโรคไหม้เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Sasanishiki โดย *A. tumefaciens* และตรวจสอบพบยีนดังกล่าวในจีโนมของต้นข้าวแปลงพันธุ์โดยเทคนิค PCR และวิเคราะห์หาโปรตีนที่สังเคราะห์จากยีนแปลกปลอมได้โดยเทคนิค western blot hybridization Stark-Lorenzen *et al.*(2001) ส่งถ่ายยีนที่มีรหัสสังเคราะห์เอนไซม์ stilbene synthase เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Nipponbare เพื่อทำให้ต้นข้าวแปลงพันธุ์มีคุณสมบัติต้านทานต่อโรคไหม้ และตรวจวิเคราะห์หายีนแปลกปลอม และ mRNA ที่สังเคราะห์จากยีนแปลกปลอมในต้นข้าวแปลงพันธุ์ด้วยเทคนิค southern blot hybridization และ northern blot hybridization ตามลำดับ ความสำเร็จของการสร้างพืชแปลงพันธุ์ขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนที่ยีนแปลกปลอมสามารถสังเคราะห์ได้ ดังนั้นปริมาณของ mRNA ต้องมีความเสถียร และสามารถเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนในกระบวนการแปลรหัสได้ และการแสดงออกของ mRNA ที่สูงเกินไปอาจทำให้ยีนเกิด silencing และทำให้พืชแปลงพันธุ์ไม่สามารถแสดงลักษณะที่ต้องการได้ (Iyer *et al.*, 2000)

บทที่ 3
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เกิดเป็นต้นใหม่สามารถทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อเจริญจากพืชมาเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส แล้วชักนำให้แคลลัสนั้นให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยแคลลัสเจริญเป็นต้นได้จาก 2 กระบวนการคือ กระบวนการกำเนิดคัพภะจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) และกระบวนการกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) แคลลัสที่เจริญเป็นต้นจากกระบวนการกำเนิดคัพภะจากเซลล์ร่างกาย เซลล์ที่มีความพร้อมจะพัฒนาผ่านขั้นตอนของการเจริญจาก globular-shape stage ไปเป็น heart stage, torpedo stage จากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นคัพภะที่เจริญเต็มที่เรียกว่า somatic embryo หรือเอ็มบริออยด์ ในกระบวนการกำเนิดคัพภะแคลลัสจะมีการเจริญและพัฒนาไปเป็นยอดและรากพร้อมกัน ส่วนแคลลัสที่มีการเจริญเป็นต้นโดยกระบวนการกำเนิดอวัยวะ เซลล์จะเจริญเป็นยอดหรือต้นเพียงอย่างเดียว นอกจากสูตร-อาหาร pH ของอาหาร ปัจจัยสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนพืช และจีโนไทป์ของพืชจะมีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สัดส่วนของออกซินและไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงที่ แตกต่างกัน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชได้ต่างกัน โดยเมื่อมีสัดส่วน ออกซินต่อไซโทไคนินสูงจะชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก แต่เมื่อสัดส่วนออกซินต่อไซโทไค-นินต่ำจะชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้น และเมื่อสัดส่วนออกซินต่อไซโทไคนินมีความสมดุลจะ ชักนำการสร้างแคลลัส (Skoog and Miller, 1957)

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้เป็นเป้าหมายสำหรับการส่งถ่ายยีนให้เจริญเป็นต้นใหม่เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการสร้างพืชแปลงพันธุ์และสามารถส่งเสริมความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้ นอกจากนี้การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับกำจัด *A. tumefaciens* จากเนื้อเยื่อพืชเป้าหมายหลังขั้นตอนการส่งถ่ายยีน และการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์เป็นอีกส่วนหนึ่งที่ต้องมีการศึกษาด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ($Ca(OCl_2)$) ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวเมล็ดข้าว

แกะเปลือกเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี แล้วล้างบริเวณผิวภายนอกด้วยผงซักฟอกและน้ำประปาให้สะอาด แช่เมล็ดข้าวในเอทานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำเมล็ดข้าวจำนวน 35 เมล็ดใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2%(w/v) เติม Tween-20 จำนวน 2-3 หยดต่อสารละลายคลอรอกซ์ 100 มล. เขย่าขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดข้าววางบนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2%(w/v), 2,4-D ความเข้มข้น 9 μM และผงวุ้น 0.8% (w/v) โดยวางให้คัพภะสัมผัสกับอาหาร นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 5 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดที่รอดชีวิตและเจริญเป็นแคลลัสโดยปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่แกะเปลือกแล้วมาล้างบริเวณผิวภายนอกด้วยผงซักฟอกและน้ำประปาให้สะอาด ฟอกกำจัดเชื้อเมล็ดข้าวโดยแช่ในเอทานอล 70% (v/v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 2%(w/v) เติม Tween-20 จำนวน 2-3 หยดต่อสารละลายคลอรอกซ์ 100 มล. เขย่าเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อวางบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v) และ 2,4-D ความเข้มข้น 4.5, 9, 13.5, 18 และ 22.5 μM อาหารทุกสูตรเติมผงวุ้น 0.8%(w/v) และปรับ pH เท่ากับ 5.7 โดยวางให้คัพภะสัมผัสกับอาหาร นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25°ซ. เมื่อครบ 30 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดที่สร้างแคลลัสและน้ำหนักสดแคลลัส

การทดลองที่ 3.3 การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในการชัก-นำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดต้นใหม่

นำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี อายุ 3 สัปดาห์ ขนาด 5 มม. ซึ่งชักนำให้เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v) และเติม NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆกัน โดยเลี้ยง

แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตรที่ 1-9 และเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีบนอาหารสูตรที่ 1-5

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น NAA (µM)	ความเข้มข้น BA (µM)
1	0	0
2	2.5	4.5
3	2.5	9
4	2.5	13.5
5	2.5	18
6	5	4.5
7	5	9
8	5	13.5
9	5	18

อาหารทุกสูตรปรับ pH เท่ากับ 5.7 และเติมผงวุ้น 0.8%(w/v) จากนั้นนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25°ซ. เมื่อครบ 45 วัน บันทึกจำนวนแคลลัสที่สร้างต้นใหม่และจำนวนต้นต่อแคลลัส

การทดลองที่ 3.4 ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินและซีโฟแทคซีมต่อแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการเกิดต้นใหม่

นำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาด 5 มม. ซึ่งชักนำให้เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D มาเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 %(w/v), NAA ความเข้มข้น 2.5 µM, BA ความเข้มข้น 13.5 µM ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซินและซีโฟแทคซีมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้

กานามัยซินความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มก./ล.

ซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 0, 50, 150, 200, 250, 300 และ 400 มก./ล.

จากนั้นนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25°ซ. เมื่อครบ 1 เดือน บันทึกจำนวนแคลลัสที่สร้างต้นใหม่และจำนวนต้นต่อแคลลัส

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 3.1 การศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวเมล็ดข้าว

การศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีพบว่าจำนวนเมล็ดที่ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มีเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไฮโปคลอไรต์และระยะเวลาที่ใช้ฟอกเพิ่มขึ้น โดยแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 2%(w/v) ระยะเวลาฟอก 45 นาที มีประสิทธิภาพสูงที่สุดสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวภายนอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท1 โดยเมล็ดข้าวเกิดแคลลัสที่ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เท่ากับ 91.4% (32±1.52 เมล็ด) และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 1.5%(w/v) ระยะเวลาฟอก 45 นาที, 2%(w/v) ระยะเวลาฟอก 30 นาทีและ 2%(w/v) ระยะเวลาฟอก 45 นาที มีประสิทธิภาพสูงที่สุดสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวภายนอกของเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรี โดยเมล็ดข้าวสามารถเจริญเป็นแคลลัสโดยไม่มีการปนเปื้อน 100% (35±0.00 เมล็ด) จากการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมไฮโป-คลอไรต์ร่วมกับระยะเวลาฟอกทุกคู่ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกัน มีค่าทางสถิติที่แตกต่างกันดังแสดงผลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัสโดยปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นแคลเซียมไฮโปคลอไรต์%(w/v)	เวลาที่ใช้ในการฟอก(นาที)					
	15		30		45	
	ชัยนาท 1	หอมสุพรรณบุรี	ชัยนาท 1	หอมสุพรรณบุรี	ชัยนาท 1	หอมสุพรรณบุรี
0.5	9.67±0.89A	14.00±1.52a	14.00±1.12AB	6.67±1.18ab	13.33±1.45B	18.00±1.00b
1.0	18.67± 1.76C	24.67± 0.33c	20.00± 1.15CD	26.00 ±2.08c	23.33 ±1.20DE	30.67± 0.48d
1.5	23.67 ±0.88E	29.67± 2.02d	24.00±1.15E	33.33± 0.82de	29.33± 0.67FG	35.00 ± 00.00e
2.0	27.67 ± 1.45F	30.00± 1.73e	30.33 ± 0.89G	35.00 ± 00.00e	32± 1.52G	35.00 ±00.00e

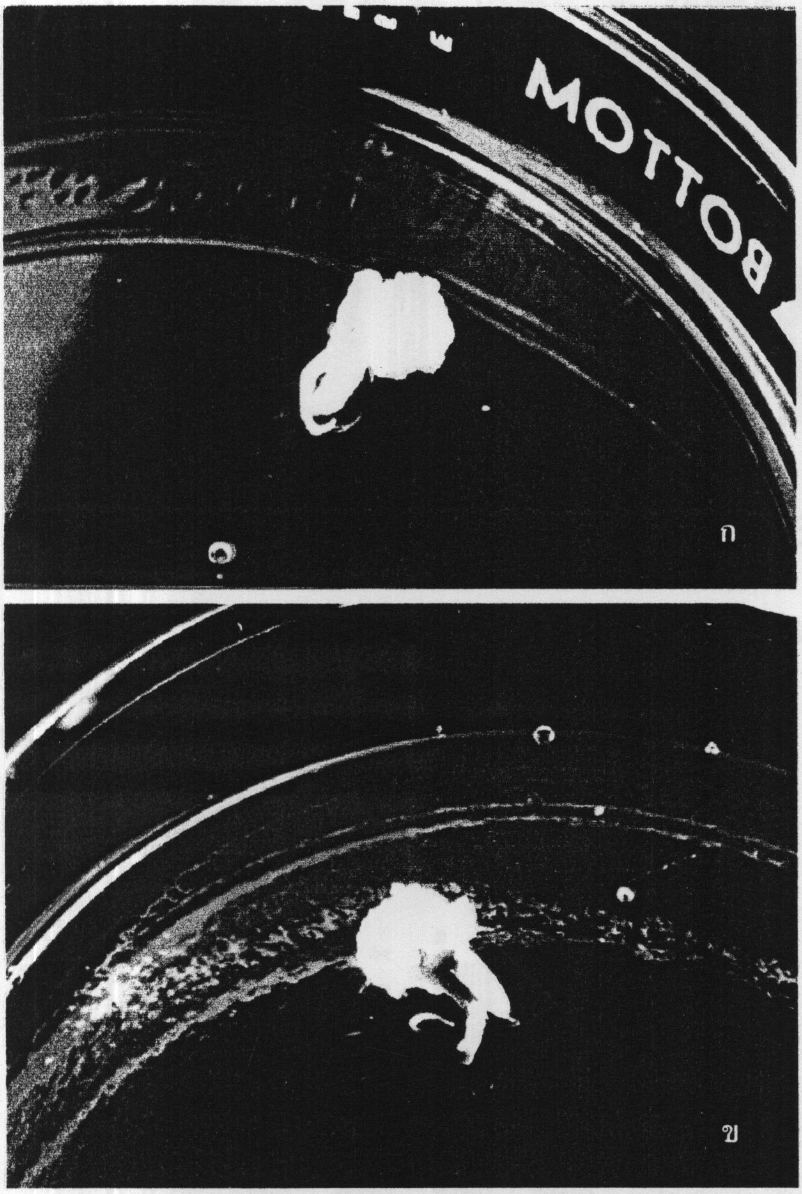
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมม์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกัน แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการทดลองที่ 3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดแคลลัส

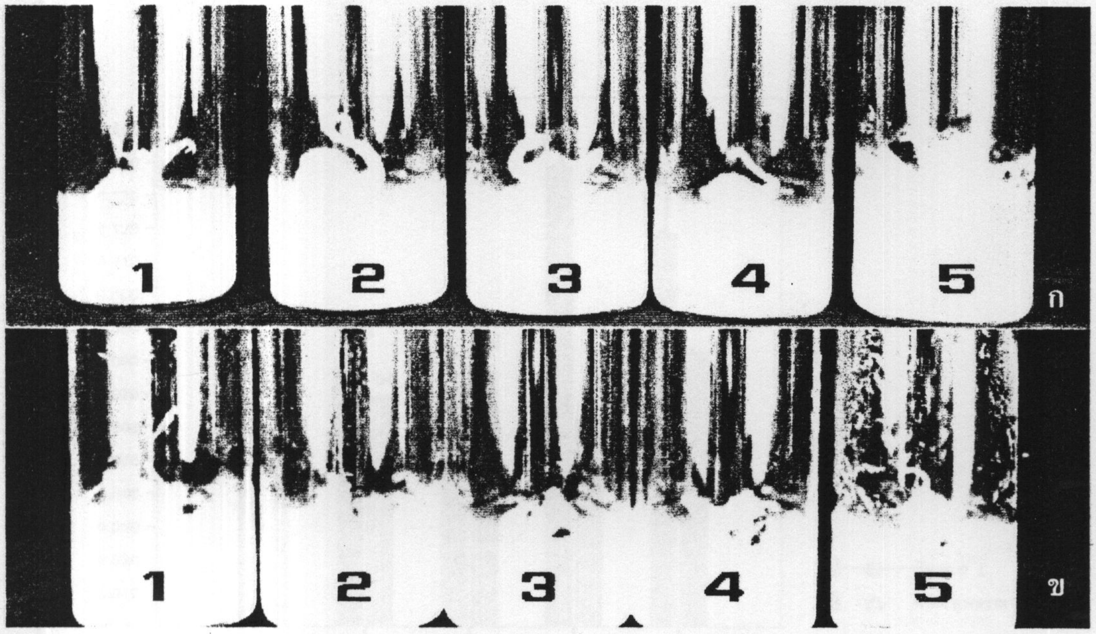
การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดแคลลัสพบว่าเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงในที่มีแสง บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v) และเติม 2,4-D ทุกความเข้มข้นสามารถเกิดแคลลัสได้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารเป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตพบบริเวณคัพภะมีลักษณะบวมขึ้นเล็กน้อย และพัฒนาไปเป็นยอดอ่อนสีเขียวและแคลลัสสีเหลืองภายใน 3-4 วัน ต่อมาแคลลัสเพิ่มขนาดขึ้นและมีลักษณะเกาะตัวกัน ในขณะที่ยอดอ่อนมีขนาดคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 2

เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีการเกิดแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 92.67% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 µM และเมล็ดข้าวสร้างแคลลัสที่มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 0.138±0.016 ก. เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18 µM อาหารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีให้มีเกิดแคลลัสคืออาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18 µM โดยเมล็ดมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 90.91±5.12 % และแคลลัสที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 0.083±0.017 ก. (ภาพที่ 3,4 และ 5)

จากการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างความเข้มข้นของ 2,4-D ทุกคู่ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสและน้ำหนักสดแคลลัสโดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกัน มีค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน(ภาพที่ 4 และ5)



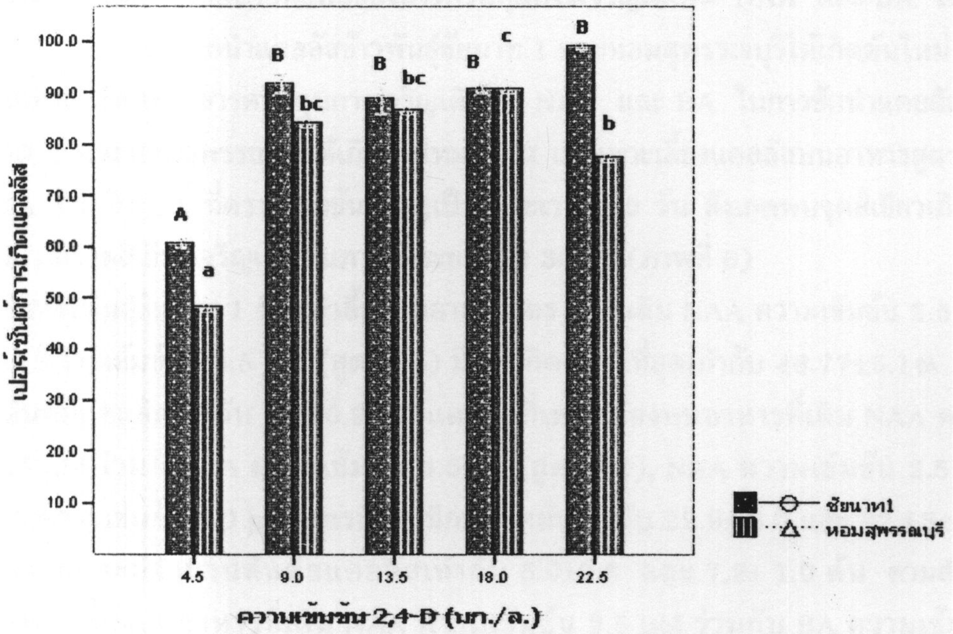
ภาพที่ 2 แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM และ 18 μM ตามลำดับ



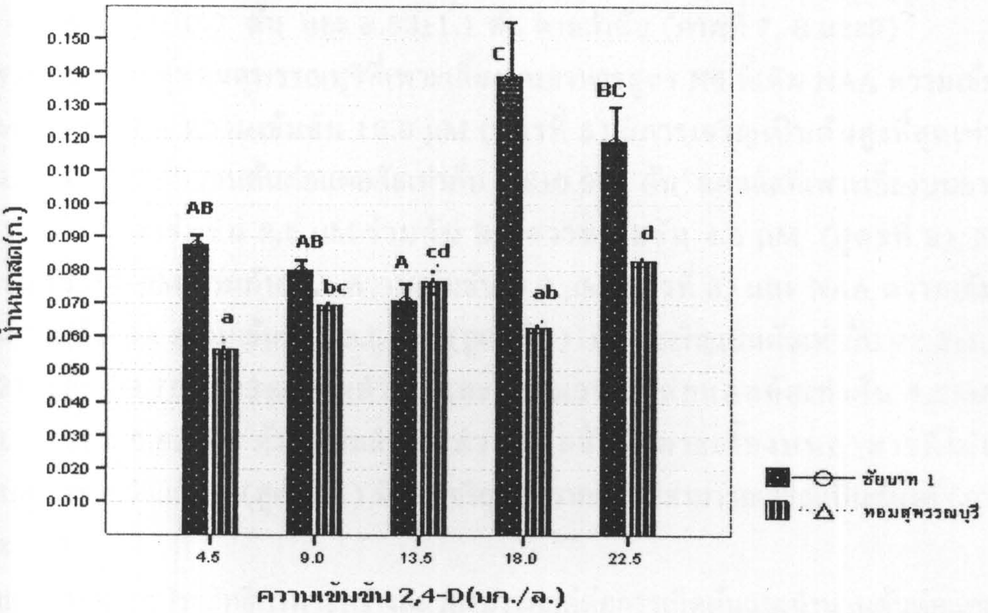
ภาพที่ 3 แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรที่ 1= 2,4-D 4.5 μM สูตรที่ 2= 2,4-D 9 μM สูตรที่ 3= 2,4-D 13.5 μM

สูตรที่ 4= 2,4-D 18 μM สูตรที่ 5= 2,4-D 22.5 μM



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงน้ำหนักสดของแคลลัสที่เจริญจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ

ผลการทดลองที่ 3.3 การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดต้นใหม่

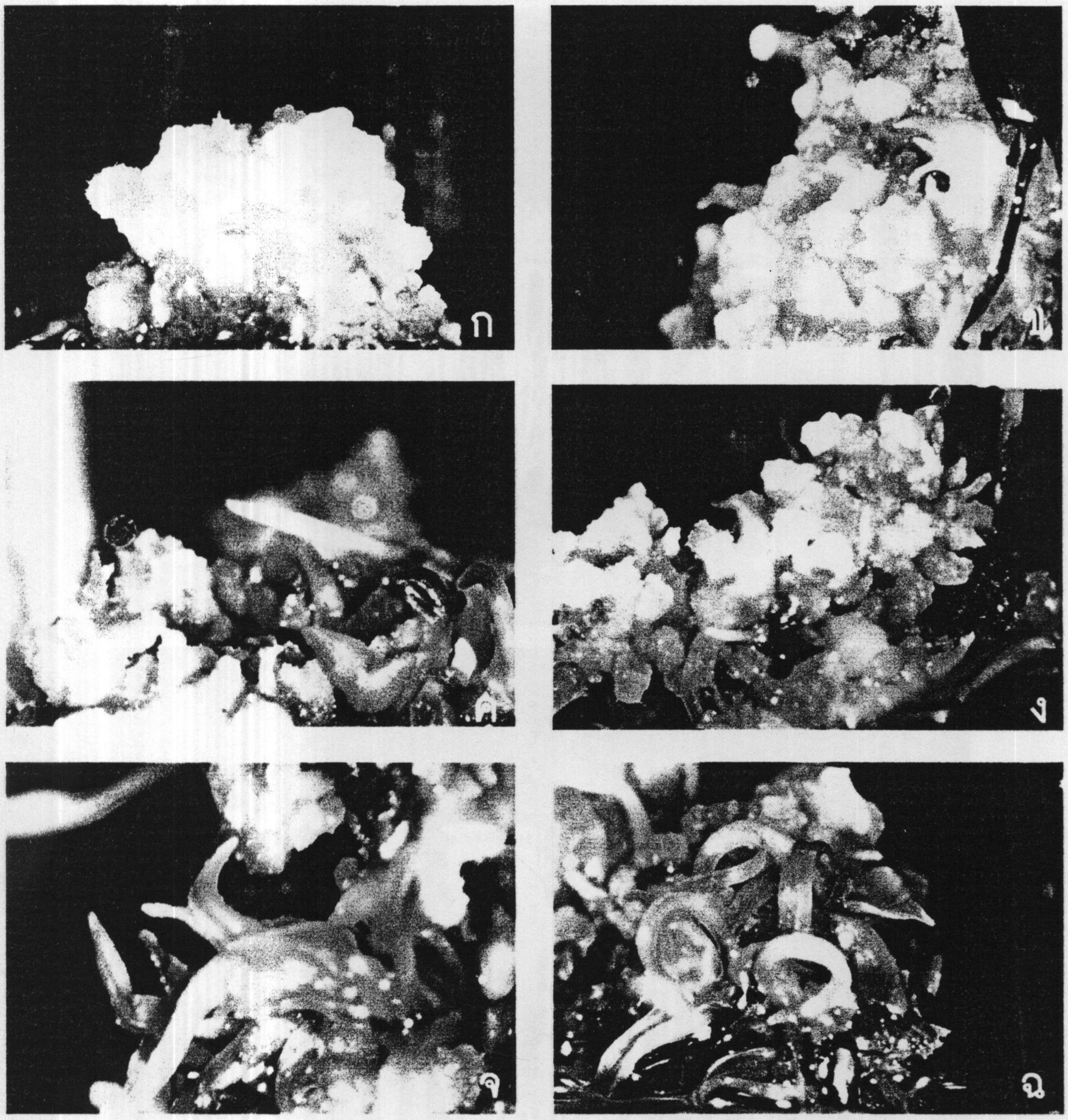
การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดต้นใหม่พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆเป็นระยะเวลา 10 วัน สังเกตพบจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนแคลลัส และจุดสีเขียวเจริญเป็นต้นภายในระยะเวลา 30 วัน (ภาพที่ 6)

แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 13.5 μM (สูตรที่ 4) มีการเกิดต้นสูงที่สุดเท่ากับ 46.77±5.1% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 9.7±0.9 ต้น แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.5 μM(สูตรที่ 2), NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 9.0 μM(สูตรที่ 3) มีการเกิดต้นเท่ากับ 22.9± 3.0 และ 32.13± 3.6 ต้น ตามลำดับและมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 5.0±0.6 และ 7.2± 1.0 ต้น ตามลำดับ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 18.0 μM (สูตรที่ 5), NAA ความเข้มข้น 5.0 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.5 μM(สูตรที่ 6), NAA ความเข้มข้น 5.0 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 9.0 μM (สูตรที่ 7) และ NAA 5.0 μM ร่วมกับ BA 13.5 μM (สูตรที่ 8) และ NAA 5.0 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 18.0 μM

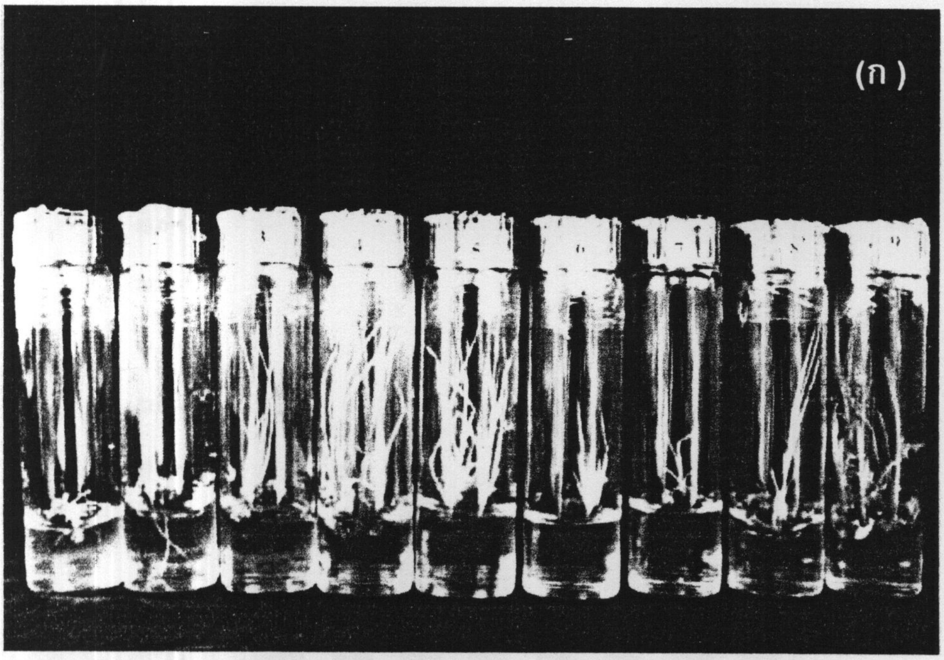
(สูตรที่ 9) มีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 28.6±4.44, 17.36±1.37, 28.73 ±1.21, 31.63± 4.9 และ 37.76± 3.6% ตามลำดับและมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 4.9 ±0.5 ต้น, 2.7± 0.1 ต้น, 4.67± 0.8 ต้น, 4.3± 0.7 ต้น และ 8.83±1.1 ต้น ตามลำดับ (ภาพที่ 7, 8 และ9)

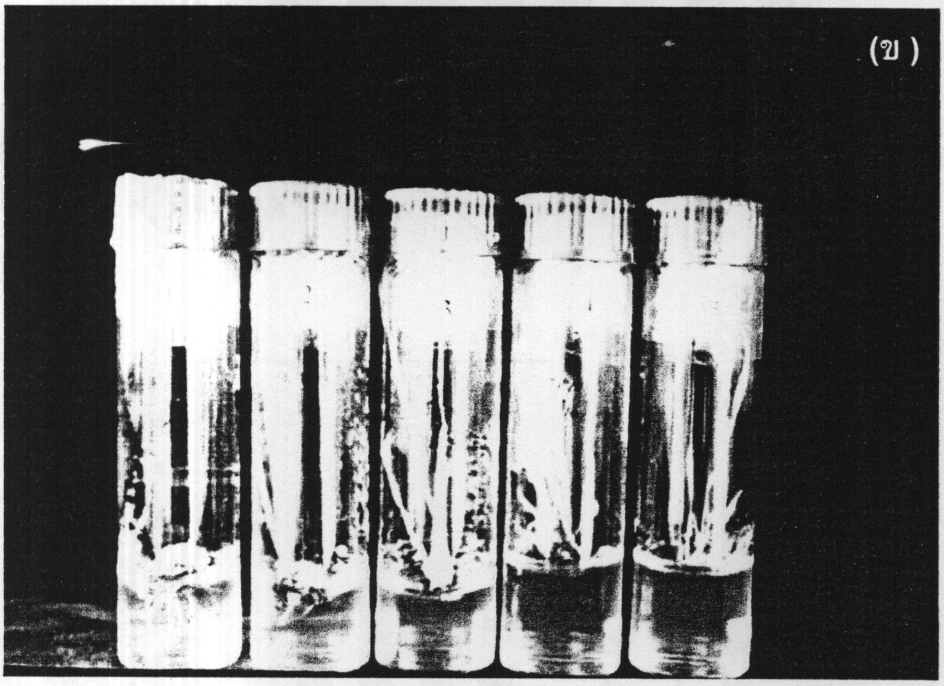
แคลลัสข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 18.0 μM (สูตรที่ 5) มีการเจริญเป็นต้นสูงที่สุดเท่ากับ 53.3±1.51% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 7.8±0.961 ต้น แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.5 μM (สูตรที่ 2), NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 9.0 μM(สูตรที่ 3) และ NAA ความเข้มข้น 2.5 μM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 13.5 μM (สูตรที่ 4) มีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 22.2±1.63, 32±2.31 และ 39.76±2.23% ตามลำดับและมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 5.23±0.6, 6.0± 0.93 และ 6.8± 0.9 ต้น ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต(สูตรที่ 1) มีการเจริญของรากแต่ไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ (ภาพที่ 10 และ 11)

จากการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างสูตรอาหารทุกคู่ต่อการเกิดต้นและจำนวนต้นต่อแคลลัส โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันมีค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน(ภาพที่ 8, 9, 10 และ 11)



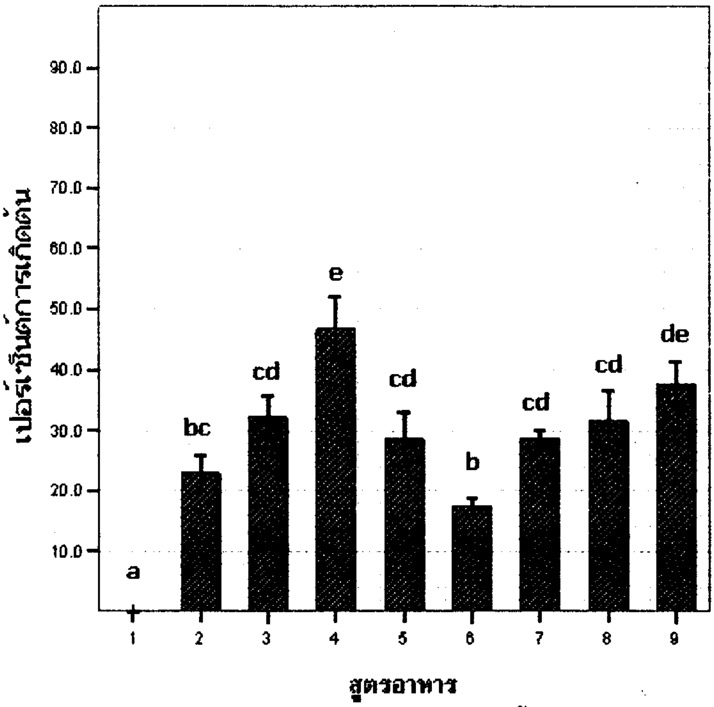
ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA เป็นเวลา 10 วัน (ก และ ข) 15-20 วัน (ค และ ง) และ 30 วัน (จ และ ฉ)



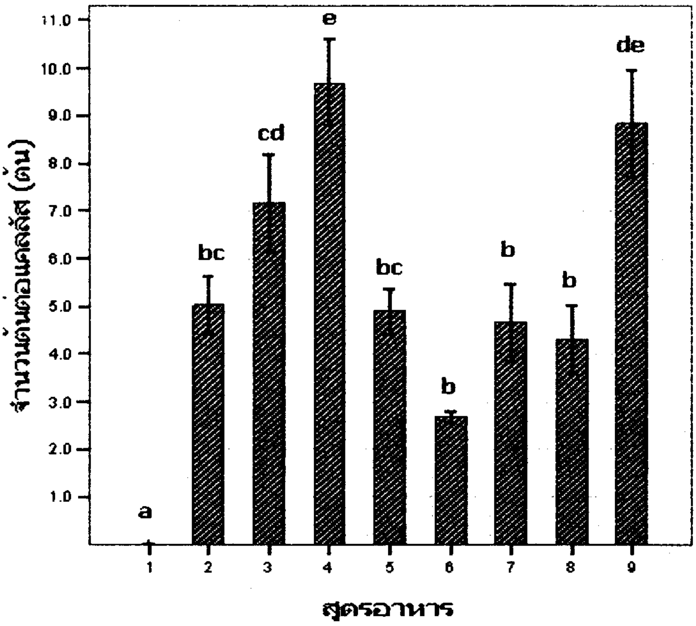


ภาพที่ 7 ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (ก) และหอมสุพรรณบุรี (ข) บนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 45 วัน

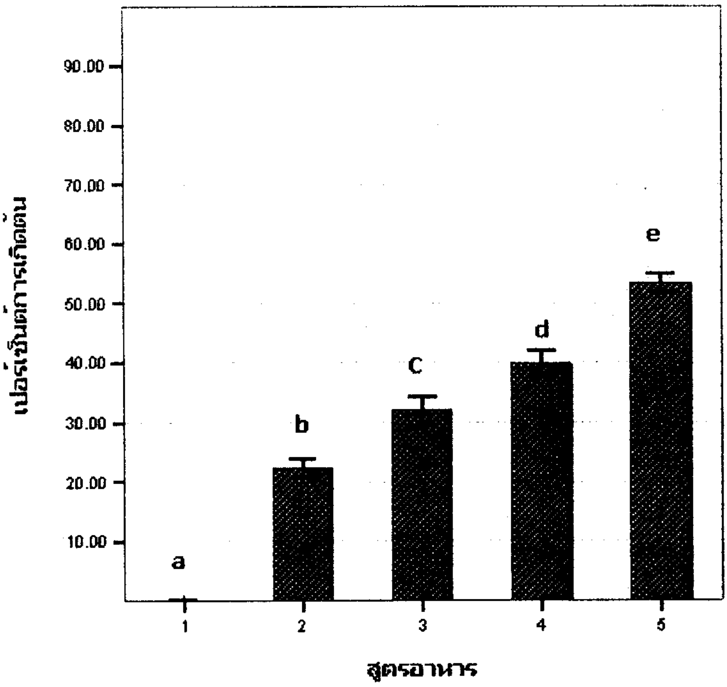
สูตรที่ 1=ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
สูตรที่ 2= NAA 2.5 μM +BA 4.5 μM
สูตรที่ 3= NAA 2.5 μM +BA 9 μM
สูตรที่ 4= NAA 2.5 μM +BA 13.5 μM
สูตรที่ 5= NAA 2.5 μM +BA 18 μM
สูตรที่ 6= NAA 5 μM +BA 4.5 μM
สูตรที่ 7= NAA 5 μM +BA 9μM
สูตรที่ 8= NAA 5 μM +BA 13.5 μM
สูตรที่ 9= NAA 5 μM + BA 18 μM



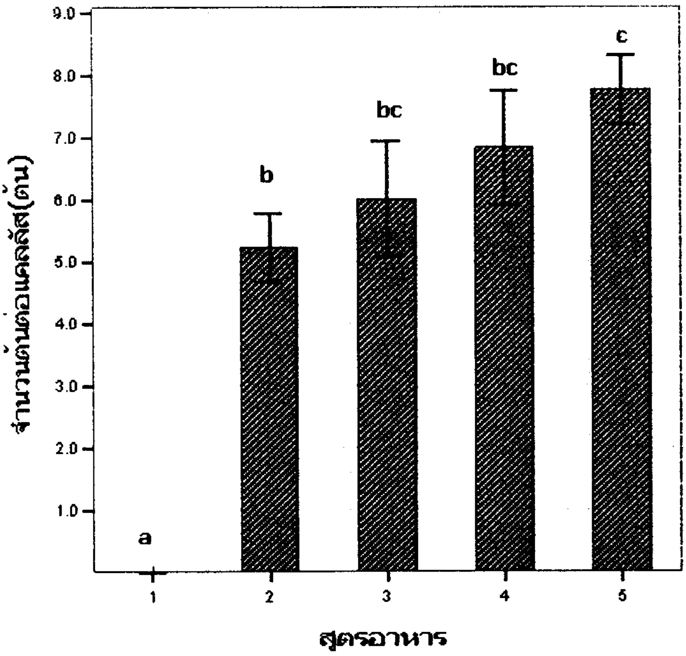
ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 9 แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ



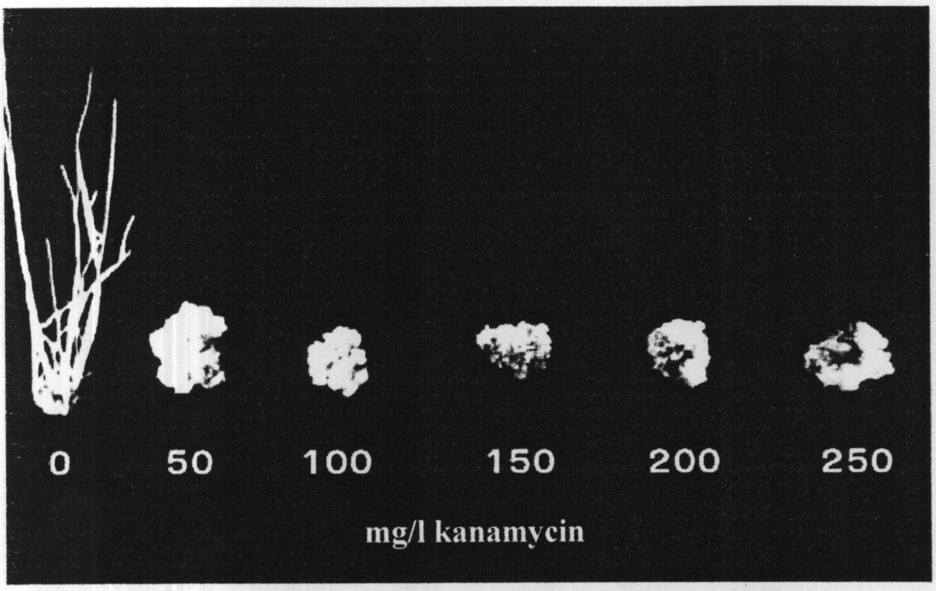
ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ

ผลการทดลองที่ 3.4 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินและซีโฟแทคซีมต่อแคลลัส ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการเกิดต้นใหม่

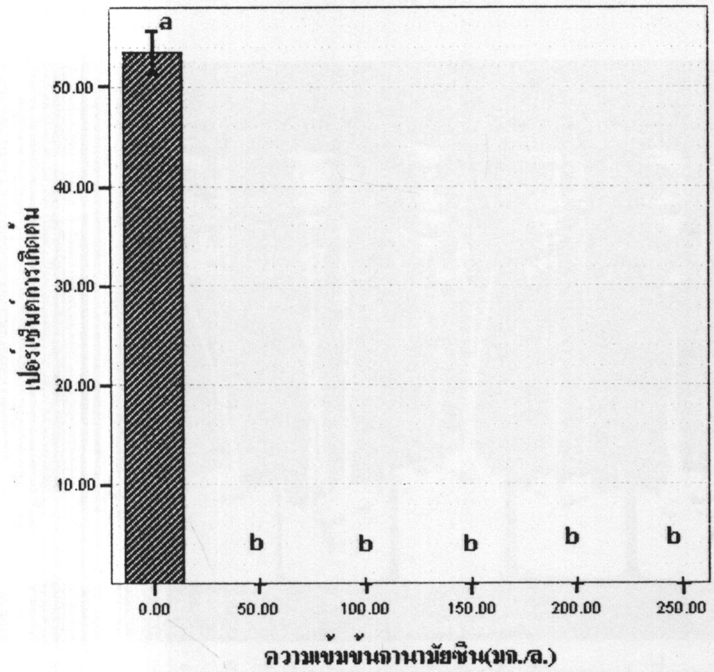
การเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 และ 100 มก./ล. ไม่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้แต่แคลลัสยังคงมีชีวิตรอด และแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินที่ความเข้มข้น 150, 200 และ 250 มก./ล. เปลี่ยนแปลงลักษณะเป็นสีน้ำตาลภายในระยะเวลา 5-7 วัน และตายในที่สุด ดังแสดงผลในภาพที่ 12 จากการทดสอบอิทธิพลระหว่างความเข้มข้นของกานามัยซินทุกคู่ต่ออัตราการเกิดต้นและจำนวนต้นต่อแคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกัน มีค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 13 และ 14)

การเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 50, 100 และ 150 มก./ล. เป็นเวลา 10-14 วัน แคลลัสเริ่มมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นและเจริญเป็นต้นได้ภายใน 45 วัน โดยแคลลัสมีการเกิดต้นเท่ากับ 53.03± 1.6, 50.00± 2.6 และ 45.00 ± 2.7% ตามลำดับ และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 8.67 ±0.7, 4.90± 0.3 และ 5.30 ±0.4 ต้นตามลำดับ ส่วนแคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 200, 250, 300 และ 350 มก./ล. เปลี่ยนแปลงลักษณะเป็นสีน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน และแคลลัสบางส่วนตายในเวลาต่อมา โดยแคลลัสมีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 37.53±4.4, 17.63± 1.2, 14.26 ±1.4 และ 12.13 ±1.5% ตามลำดับ และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 4.63± 0.7, 3.10± 0.4, 2.53± 0.3 และ 1.33 ±0.3 ต้น ตามลำดับ ดังแสดง-ผลในภาพที่ 15, 16 และ 17 จากการทดสอบอิทธิพลระหว่างความเข้มข้นของซีโฟแทคซีมต่ออัตราการเกิดต้นและจำนวนต้นต่อแคลลัสทุกคู่ โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันมีค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน(ภาพที่ 16 และ 17)

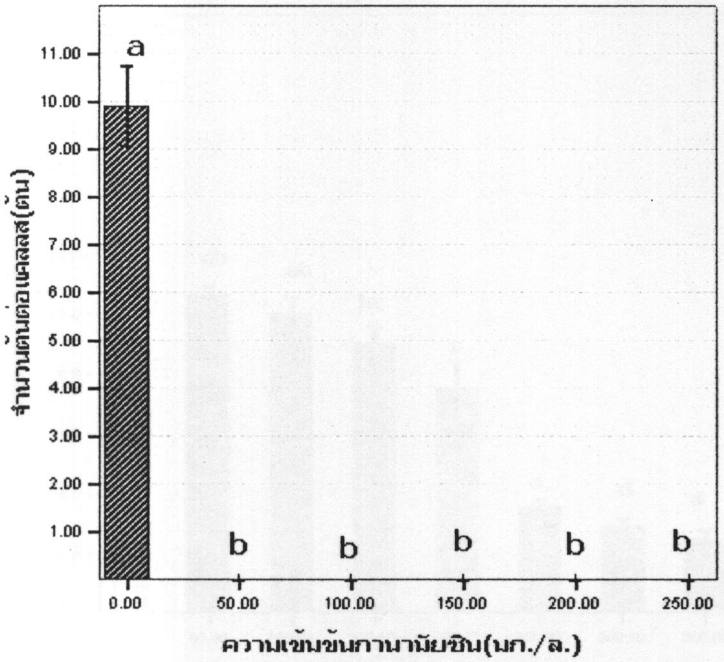
การเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 10 วัน เริ่มมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนแคลลัสและจุดสีเขียวเจริญเป็นต้นภายใน 30 วัน โดยมีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 55.6± 3.7% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 9.0±1.2 ต้น



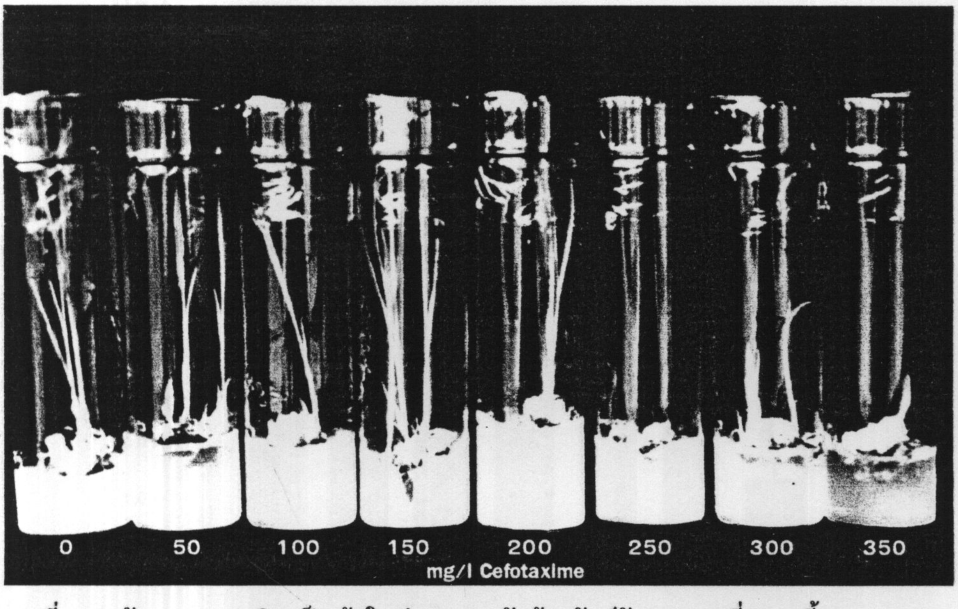
ภาพที่ 12 ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ



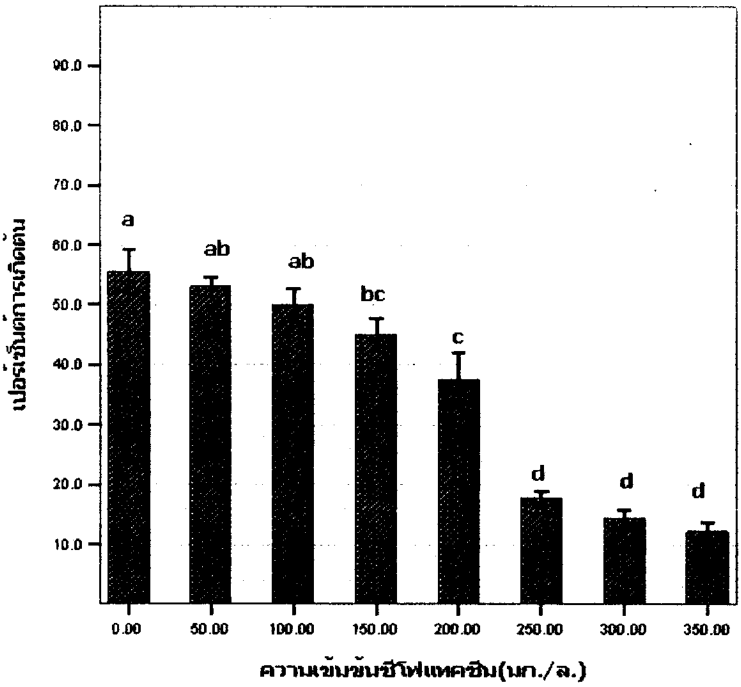
ภาพที่ 13 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นและเติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ



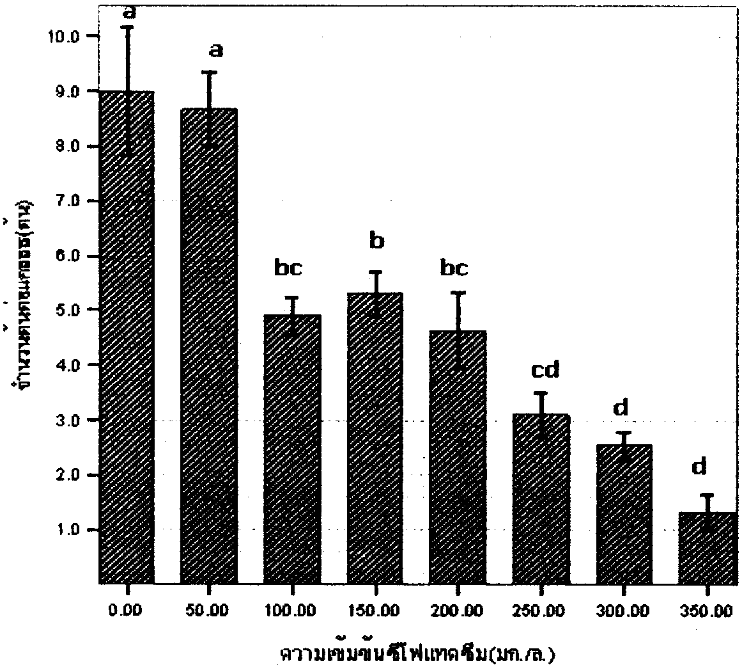
ภาพที่ 14 แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นและเติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 16 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นและเติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 17 แผนภูมิแสดงจำนวนต้นต่อแคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นและเติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้นต่าง ๆ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี พบว่า สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 2%(w/v) และระยะเวลาฟอก 45 นาที มีประสิทธิภาพสูงที่สุดสำหรับการกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากผิวของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ส่วนความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรี คือ 1.5%(w/v) ระยะเวลาฟอก 45 นาที การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (contamination) เป็นปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากทำให้พืชมีการเจริญลดลงและตาย (Leifert *et al.*, 1989) การเลือกความเข้มข้นของสารฟอกกำจัดเชื้อและระยะเวลาฟอกที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเชื้อผิวภายนอกของเนื้อเยื่อพืชมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพและความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แคลเซียมไฮโปคลอไรต์เป็นสารเคมีที่นิยมใช้สำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวภายนอก มีคุณสมบัติกำจัดแบคทีเรีย, ไวรัส และไมโคพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเพิ่มความเข้มข้นของสารฟอกกำจัดเชื้อและระยะเวลาฟอกจะทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเพิ่มขึ้น แต่อาจทำให้ความมีชีวิตของเซลล์พืชเกิดความเสียหายได้ จึงควรทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมก่อน ความเข้มข้นของแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ที่ใช้โดยทั่วไปคือ 9-10% ระยะเวลาฟอก 5-30 นาที สารเคมีอื่น ๆที่นิยมใช้สำหรับการฟอกกำจัดเชื้อ ได้แก่ อัลกอฮอล์ โซเดียมไฮโปคลอไรต์(Na (OCl_2)) และเมอคิวริคลอไรด์ ($HgCl_2$) (Bishnoi *et al.*, 2000) การใช้น้ำยาฟอกกำจัดเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดในการฟอกกำจัดเชื้อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดสิ่งปนเปื้อนได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้แช่เมล็ดข้าวในเอธานอล 70% เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ Li *et al.*(1999) รายงานการฟอกกำจัดเชื้อผิวเมล็ดข้าวสาลีด้วยเอธานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 1 นาที และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1%(w/v) เป็นเวลา 20 นาที Afza *et al.*(2000) ฟอกกำจัดเชื้อผิวของรวงข้าวด้วยเอธานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 20 วินาที และสารละลายคลอรอกซ์ 10%(v/v) เป็นเวลา 10 นาที Chuenboonngarm *et al.* (2001) รายงานการฟอกกำจัดเชื้อปลายยอดของต้นมะลิโดยนำปลายยอดแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 15%(v/v) เป็นเวลา 10 นาที และสารละลายคลอรอกซ์ 10%(v/v) อีกเป็นเวลา 10 นาที

จากการศึกษาอิทธิพลของ 2,4-D ต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดแคลลัสพบว่า อาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v) ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นแคลลัส โดยเมล็ดมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 92.67% และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.1 ก. สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีเจริญเป็นแคลลัสคืออาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18 μM โดยเมล็ดมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 90.9% เนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมสำหรับนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสต้องเป็นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์เจริญ

(meristematic cells) ได้แก่ ราก ปลายยอด และเนื้อเยื่อบริเวณข้อ (Bhaskaran and Smith, 1990) Maeda (1980) รายงานว่าคัพภะข้าวส่วนใหญ่สร้างแคลลัสจากเนื้อเยื่อ scutellum และจากการศึกษาพบว่าสามารถชักนำการสร้างแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดแคลลัสได้จากบริเวณคัพภะ จึงกล่าวได้ว่าเนื้อเยื่อ scutellum เป็นเซลล์เจริญที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส มีรายงานการชักนำเนื้อเยื่อส่วนอื่นของข้าวให้เกิดแคลลัส Oinam and Kothari (1995) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของข้าวพันธุ์ CH1039 อายุ 3-7 วัน ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มก./ล. โดยแคลลัสมีลักษณะเป็น embryogenic callus และ non-embryogenic callus Davinder *et al.*(1993) รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ ช่อดอกอ่อน(immature panicle) และอับเรณูของข้าวพันธุ์ Basmati 370 และ Pusa Basmati ให้เกิดแคลลัสได้บนอาหารที่เติมไคเนตินร่วมกับสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น สารสกัดจากยีสต์ ไรโบฟลาวิน(riboflavin) ทริปโตเฟน น้ำมะพร้าวและเคซีนไฮโดรไลเสท

2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน นิยมเติมในอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสและรักษาสภาพการเลี้ยงแคลลัส แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า 2,4-D มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัส และกระบวนการกำเนิดคัพภะของแคลลัส (Mitsuoka *et al.*,1994) กลไกการทำงานของ 2,4-D ใน embryogenic plant cell ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด แต่เชื่อว่า auxin carrier ทำหน้าที่ลำเลียง 2,4-D เข้าสู่เซลล์พืช (Debarre *et al.*, 1996) ความเข้มข้นของ 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันในข้าวแต่ละสายพันธุ์ Kunanuvatchaidach *et al.*(1995) ศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวอินดิกาจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ Kurkaruppan, FR13A, ข้าวดอกมะลิ 105, น้ำสะกุย และปิ่นแก้ว 56 บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 μM และรายงานว่าประสิทธิภาพของการชักนำเมล็ดข้าวให้เกิด embryogenic callus ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของพืช การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีการการเกิดแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 100% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM ส่วนเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีมีการการเกิดแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 98% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18 μM ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Kucherenko(1993) รายงานเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวจาโปนิกาจำนวน 6 สายพันธุ์ บนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ และรายงานว่าเมล็ดข้าวมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 100% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มก./ล. Yang *et al.*(1999) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Taipei 309 ให้สร้างแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9.05 μM ในที่มืด แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะไม่เกาะตัวกัน และพัฒนาเป็น somatic embryo ได้น้อย จึงทำให้แคลลัสมีการเจริญเป็นต้นใหม่ได้ต่ำ Jose Pons *et al.*(2000) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ Senia, Tebre และ Bahia ให้สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล. Zhang

et al. (1996) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Aikoku, Sen-ichi และ Moritatawase บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล.

มีรายงานการชักนำคัพภะข้าวให้สร้างแคลลัสบนอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด Marassi *et al.*(1996) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2ip ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ Basmati 370 ให้สร้างแคลลัส Lutts *et al.*(1999) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวจาโปนิกาพันธุ์ I Kong และ Pao Aiwa และข้าวอินดิกาพันธุ์ IR2153 และ Nona Bokra บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล., NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. โดยแคลลัสมีการเกิด embryogenic callus เท่ากับ 62.4-76.5%

จากการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีต่อการเกิดต้นใหม่พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นต้นใหม่คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v), NAA 2.5 µM, BA 13.5 µM และผงวุ้น 0.8%(w/v) โดยแคลลัสมีการเกิดต้นเท่ากับ 46.76% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 9.7 ต้น และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการ-ชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีให้เจริญเป็นต้นใหม่คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v), NAA 2.5 µM, BA 18 µM และผงวุ้น 0.8% (w/v) โดยแคลลัสมีการเกิดต้นเป็นต้นใหม่เท่ากับ 53.3% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 7.7 ต้น แต่แคลลัสข้าวทั้งสองพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rueb *et al.*(1994) ซึ่งรายงานว่าการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ Taipei 309 ให้เกิดต้นใหม่ได้บนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยแคลลัสมีการเกิดเป็นต้นใหม่เท่ากับ 93%

ผลการศึกษาพบว่าแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนระหว่าง NAA และ BA ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Skoog and Miller (1957) ซึ่งกล่าวว่าสัดส่วนของออกซินและไซโทไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันมีผลต่อกระบวนการกำเนิดอวัยวะได้ต่างกัน โดยเมื่อมีสัดส่วนออกซินต่อไซโทไคนินสูงจะชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก แต่เมื่อสัดส่วนออกซินต่อไซโทไคนินต่ำจะชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้น Oinam and Kothari(1993) รายงานความสำเร็จในการชักนำแคลลัสของข้าวอินดิกาพันธุ์ Chambal, Himhan และ CH1039 ได้ด้วยการนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. Zhang *et al.*(1996) รายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Aikoku และ Sen-ichi ให้เกิดต้นใหม่ได้บนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 มก./ล. ร่วมกับ KI ความเข้มข้น 8 มก./ล. โดยแคลลัสมีการเกิดต้นเท่ากับ 85%

จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการเกิดต้นใหม่พบว่า กานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีผลยับยั้งการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าว หลักการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์คือยับยั้งการเจริญของพืชปกติโดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อพืชแปลงพันธุ์ (Vasil, 1994) ในการส่งถ่ายยีนสู่พืชนิยมนำยีนที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชมาใช้เพื่อเป็นยีนคัดเลือก เนื่องจากพืชโดยทั่วไปไม่มียีนเหล่านี้ วิธีการคัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ทำได้โดยนำพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชในความเข้มข้นที่เหมาะสม พืชปกติซึ่งไม่มียีนที่กำหนดการสร้างความต้านทานต่อสารจะไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่บนอาหารได้ ทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพกานามัยซินเป็นสารปฏิชีวนะประเภทอะมิโนไกลโคไซด์มีฤทธิ์ต่อไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ของพืช โดยสามารถจับกับ 30S subunit ของไรโบโซม ทำให้เซลล์พืชไม่สามารถแปลรหัสและลอกรหัสเพื่อสร้างโปรตีนได้ พืชที่ได้รับกานามัยซินจะแสดงอาการเหลืองซีด เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และตายในที่สุด มีรายงานการทดลองที่ใช้กานามัยซินเป็น selective agent ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าวโพด (Gould *et al.*, 1991; Lyznik *et al.*, 1989), ข้าวสาลี (Hauptmann *et al.*, 1988) และข้าว (Dekeyser *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1992)

การทดลองที่ 4.2 ในบทที่ 4 เป็นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *A. tumefaciens* และเวกเตอร์ที่ใช้ในการศึกษามียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นยีนคัดเลือก จึงจำเป็นต้องศึกษาหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของกานามัยซินที่มีผลยับยั้งการเกิดต้นใหม่ของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกข้าวแปลงพันธุ์ออกจากข้าวปกติ และจากการศึกษาพบว่ากานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน มีรายงานการคัดเลือกข้าวแปลงพันธุ์สายพันธุ์ต่าง ๆในอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นแตกต่างจากผลการทดลองครั้งนี้ Chan *et al.*(1992) รายงานการส่งถ่ายยีนคัดเลือกกานามัยซินเข้าสู่แคลลัสของข้าวอินดิกาพันธุ์ Taichung Native1 โดย *A. tumefaciens* และคัดเลือกแคลลัสแปลงพันธุ์ออกจากแคลลัสปกติได้บนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล.

จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมต่อแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการเกิดต้นใหม่พบว่าซีโฟแทคซีมที่ 250 มก./ล. เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีผลยับยั้งการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัส โดยแคลลัสเจริญเป็นต้นได้ 17.63±1.2% ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *A. tumefaciens* ภายหลังการบ่มเนื้อเยื่อพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* จำเป็นต้องกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการพืชที่ติดเชื้อ *A. tumefaciens* เป็นเวลานานจะมีการเจริญต่ำและตายในที่สุด ซีโฟแทคซีมเป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัด *A. tumefaciens* ที่มีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ

A. tumefaciens ในอาหารเพาะเลี้ยงอาจส่งผลเสียต่อการเจริญของเนื้อเยื่อได้เช่นกัน (Barrett and Cassells, 1994) ดังนั้นการเติมซีโฟแทคซีมในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากแคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 250 มก./ล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่ส่งผลเสียต่อการเจริญของแคลลัสมากนัก แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะชนิดเดียวกันนี้ที่มีต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* ด้วยเพื่อให้ทราบความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถกำจัด *A. tumefaciens* อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นความเข้มข้นที่ไม่ยับยั้งการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าว ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Nauerby *et al.*(1997) ที่รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินความเข้มข้น 1000 มก./ล. มีผลยับยั้งการเกิดต้นและรากของแคลลัสยาสูบพันธุ์ Petit Havana แต่ Severin and Schoeffl (1990) รายงานการกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อใบยาสูบโดยนำใบยาสูบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 500 มก./ล. พบว่าสามารถกำจัด *A. tumefaciens* ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีผลใด ๆต่อการเจริญของยาสูบ

บทที่ 4
การส่งถ่ายยีน

บทนำ

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชแบ่งออกได้ 2 วิธี คือการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง และการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2541) รายงานความสำเร็จในการสร้างต้นข้าวแปลงพันธุ์ในระยะแรกเกิดจากการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง เช่น การใช้สารเคมี PEG, การใช้กระแสไฟฟ้า และการใช้เครื่องยิง การใช้สารเคมี PEG และการใช้กระแสไฟฟ้าต้องนำโพรโทพลาสต์มาใช้เป็นเป้าหมายสำหรับการส่งถ่ายยีน ทำให้ประสบปัญหาในขั้นตอนการชักนำโพรโทพลาสต์ให้เกิดต้น และต้นที่ชักนำให้เกิดจากโพรโตพลาสต์มักมีลักษณะผิดปกติ (Datta *et al.*, 1992b) มีรายงานว่าพืชแปลงพันธุ์ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยการยิงกระสุนมีการสอดแทรกของยีนแปลก-ปลอมในจีโนมพืชหลายสำเนาและมีการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนแปลกปลอม ทำให้การแสดงออกของยีนในพืชแปลงพันธุ์มีความไม่เสถียร (Tada *et al.*,1990; Aldemita and Hodges, 1996)

A. tumefaciens เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อโรค crown gall ในพืชใบเลี้ยงคู่ได้ เนื่องจากภายในเซลล์มีพลาสมิดขนาดใหญ่ เรียกว่า tumor inducing(Ti) plasmid พลาสมิดชนิดนี้ประกอบด้วยบริเวณที่สำคัญ เรียกว่า T-DNA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนิน T-DNA สามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์พืชและสอดแทรกในโครโมโซมพืชได้ จึงทำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัวอย่างผิดปกติและเกิดลักษณะปุ่มปมขึ้น ความสามารถตามธรรมชาติของ *A. tumefaciens* ได้ถูกนำมาดัดแปลงใช้เพื่อการส่งถ่ายยีนในพืชอย่างแพร่หลาย มีรายงานว่าการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *A. tumefaciens* เป็นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่มีประสิทธิ-ภาพสูงกว่าการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง เนื่องจากบริเวณ T-DNA มีขอบเขตที่แน่นอน ดังนั้นเมื่อ T-DNA สอดแทรกในจีโนมพืชจึงไม่มีการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนแปลกปลอม(Dong *et al.*, 1996) การศึกษาในบทนี้ได้ทำการทดลองเพื่อส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี โดย *A. tumefaciens* และวิธียิงกระสุน และยืนยันผลการสอดแทรกของยีนแปลกปลอมในต้นข้าวแปลงพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR รวมทั้งศึกษาการถ่ายทอดยีนแปลกปลอมจากต้นข้าวแปลงพันธุ์สู่รุ่นลูก

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซินลินต่อการเจริญของ *A. tumefaciens*

นำโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* ทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มล. โดยเลี้ยง *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) ในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 100 มล./ล. ร่วมกับสเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 25 มล./ล. และเลี้ยง *A. tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA1301) ในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มล./ล. ร่วมกับกานามัยซินความเข้มข้น 50 มล./ล. นำขวดรูปชมพู่วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้เท่ากับ 1.0 ปิเปตเชื้อจำนวน 100 µl ใส่บนจานแก้วที่มีอาหารแข็ง LB (เติมสารปฏิชีวนะชนิดเดียวกัน) แล้วใช้แท่งแก้วที่ดัดเป็นรูปสามเหลี่ยมปาดเชื้อให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนกระทั่งแห้ง นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. จุ่มลงในสารละลายซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มก./ล. แล้ววางลงในจานเพาะเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลาข้ามคืน บันทึกความยาวจากขอบกระดาษกรองถึงขอบของวงใส (zone of inhibition)

การทดลองที่ 4.2 การส่งถ่ายยีนสู่ข้าว

4.2.1 <u>การส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดย *A. tumefaciens*</u>

ในการศึกษานี้ใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์สำหรับการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้แก่ LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) (ภาพที่ 18 และ 19) โดยนำโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียมทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 20 มล. โดยเลี้ยง LBA4404 (pBI121) ในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 100 มล./ล. และสเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 25 มล./ล. และเลี้ยง EHA105 (pCAMBIA1301) ในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มล./ล. และกานามัยซินความเข้มข้น 50 มล./ล. นำขวดมาวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้เท่ากับ 1.0 นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกกำจัดเชื้อแล้ววางลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารแขวนลอยแบคทีเรีย เขย่าจานเพาะเชื้อเบา ๆ เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่เมล็ดทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ซับเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatmann No.1 ฆ่าเชื้อ แล้วนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%, 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 µM และผงวุ้น 0.8%(w/v) (pH = 5.8) ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 3 วัน แล้วกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อพืชโดยนำเมล็ดไปแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติมซีโฟแทกซีม

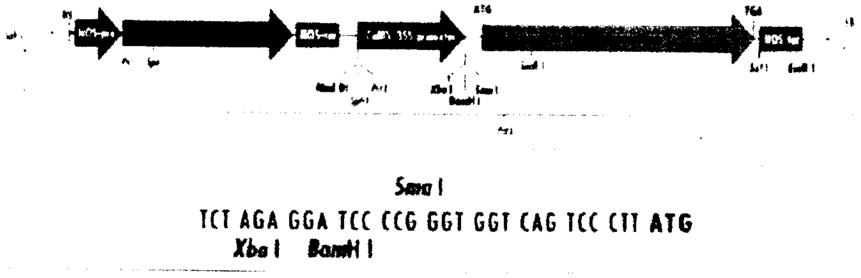
ความเข้มข้น 250 มล./ล. เป็นเวลา 15 นาที ซับเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatmann No.1 ฆ่าเชื้ออีกครั้ง แล้วย้ายเมล็ดที่ได้รับการส่งถ่ายยีนผ่าน *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 250 มล./ล. ร่วมกับกานามัยซินความเข้มข้น 50 มล./ล. ส่วนเมล็ดที่ได้รับการส่งถ่ายยีนผ่าน *A. tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA1301) นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 250 มล./ล. ร่วมกับไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20 มล./ล. เป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตไปเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2% (w/v), NAA ความเข้มข้น 2.5 µM, BA ความเข้มข้น 13.5 µM และผงวุ้น 0.8%(w/v) (pH = 5.8) และเติมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับอาหารสูตรเดิม ภายใต้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25°ซ.

4.2.2 <u>การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี *gus* assay</u>

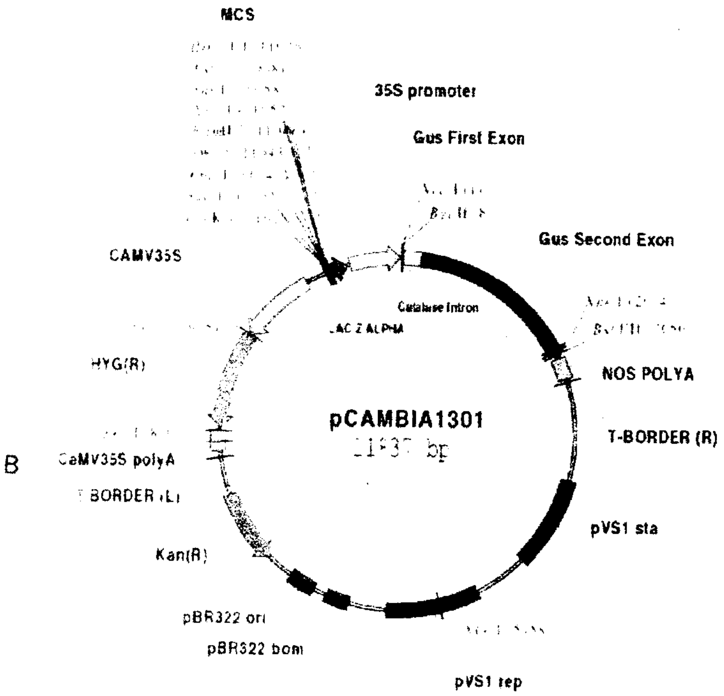
นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งได้แก่ แคลลัสและใบข้าว มาซับด้วยกระดาษกรองให้แห้ง ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเติม X-gluc assay buffer ให้ท่วมเนื้อเยื่อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับใบข้าวให้นำแช่ในเอธานอล 95% จนกระทั่งไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ จึงตรวจสอบสีของเนื้อเยื่อ

4.2.3 <u>การตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)</u>

นำใบจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน และใบจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ควบคุม มาสกัดดีเอนเอด้วยวิธี CTAB method เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการตรวจสอบ ดีเอนเอเริ่มต้นที่ใช้สำหรับการทำ PCR คือ CaMV35S(5′-GCTCCTACAAATGCCATCA-3′ และ 5′-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3′) และสภาวะของการทำ PCR คือ pre-denaturation ที่ 94°ซ./3 นาที จำนวน 1 รอบ; denaturation 94°ซ./20 วินาที, annealing ที่ 50°ซ./40 วินาที, extension 72°ซ./60 วินาที จำนวนรอบ 40 รอบ; final extension 72°ซ./3 นาที จำนวน 1 รอบ และ cooling phase 4°ซ./1 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)



ภาพที่ 18 โครงสร้างพลาสมิด pBI121 (Clontech Laboratories,1994)



ภาพที่ 19 โครงสร้าง T-DNA ของพลาสมิด pCAMBIA1301 (Clontech Laboratories,1994)

การทดลองที่ 4.3 การส่งถ่ายยีนสู่ข้าวโดยวิธียิงกระสุน

4.3.1 การสกัดพลาสมิด

เลี้ยง *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) ในอาหารเหลว LB ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มก./ล และ สเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 25 มก./ล. นานข้ามคืน ปิเปตเชื้อ ปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แบคทีเรียตกตะกอน ดูดของเหลวชั้นบนทิ้งไปแล้วละลายตะกอนเซลแบคทีเรียด้วย STB buffer ปริมาตร 100 µl เติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 100 µl แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลวชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย 10M ammonium acetate ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2M เติมเอทานอลเย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่น้ำแข็งต่ออีก 15 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ดีเอนเอตกตะกอน ล้างตะกอนดีเอนเอด้วยเอทานอล 70% หลังผึ่งตะกอนดีเอนเอแห้งแล้ว ล้างตะกอนด้วย TE buffer 20 µl เติม RNase A (10 มก./ล.) 2 µl แล้วนำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ในตู้แช่แข็ง -20 °ซ.

4.3.2 การเคลือบกระสุนด้วยดีเอนเอ

1. ชั่งกระสุนทองคำขนาด 1 µm น้ำหนัก 30 มก. ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มล. โดยเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 1 มล. แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 3-5 นาที ทิ้งกระสุนให้แช่ในเอทานอล 70% ต่อไปอีก 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีก5 วินาทีเพื่อให้กระสุนตกตะกอน ดูดของเหลวชั้นบนทิ้งไป เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้กระสุนตกตะกอนดูดของเหลวชั้นบนทิ้งไป แล้วเติมกลีเซอรอล 50 % ปริมาตร 500 µl

2. ดูดกระสุนทองคำที่อยู่ในสารละลายกลีเซอรอลปริมาตร 50 µl ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเติมพลาสมิด (pBI121 และ pCAMBIA1301) ปริมาตร 5 µl, 2.5 M $CaCl_2$ ปริมาตร 50 µl และ 0.1 M spermidine ปริมาตร 20 µl โดยขณะเติมต้องให้หลอดวางบนเครื่อง vortex ตลอดเวลา หลังเติมสารครบแล้ว vortex หลอดต่อไปอีก 2-3 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 1 นาที นำกระสุนไปปั่นเหวี่ยง 2 วินาที ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วล้างกระสุนอีก 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล 70% และเอธานอล 100% ละลายตะกอนกระสุนทองคำด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 140 µl แล้วนำเคลือบบน macrocarrier

3. ยิงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี ด้วยเครื่อง Biolistic PDS1000/He,BIO-RAD โดยใช้กระสุนทองคำขนาด 1 µm ที่เคลือบด้วยพลาสมิด pBI121 และ พลาสมิด pCAMBIA1301 ด้วย helium pressure 1,300 psi, vaccuum inches 28, target distance 9 ซม. นำแคลลัสที่ยิงด้วยกระสุนที่เคลือบด้วยพลาสมิด pBI121 ไปเลี้ยงบนอาหาร

สูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM และกานามัยซิน 50 มก./ล. และเลี้ยงแคลลัสที่ยิงด้วยกระสุนที่เคลือบด้วยพลาสมิด pCAMBIA1301 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 18 μM ร่วมกับไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล.

การทดลองที่ 4.4 การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มาแกะเปลือก ล้างด้วยผงซักฟอกและน้ำประปาให้สะอาด แช่เมล็ดข้าวในเอทานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ 2%(w/v) และ Tween-20 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาทีต่อครั้ง โดยเขย่าขวดเป็นครั้งคราว ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v) และผงวุ้น 0.8%(w/v) และกานามัยซินที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวจำนวน 45 เมล็ดต่อความเข้มข้น นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25°ซ. ความเข้มแสง 1000 ลักซ์, 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอก น้ำหนักสดต้นและราก

การทดลองที่ 4.5 การศึกษาอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานต่อกานามัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์

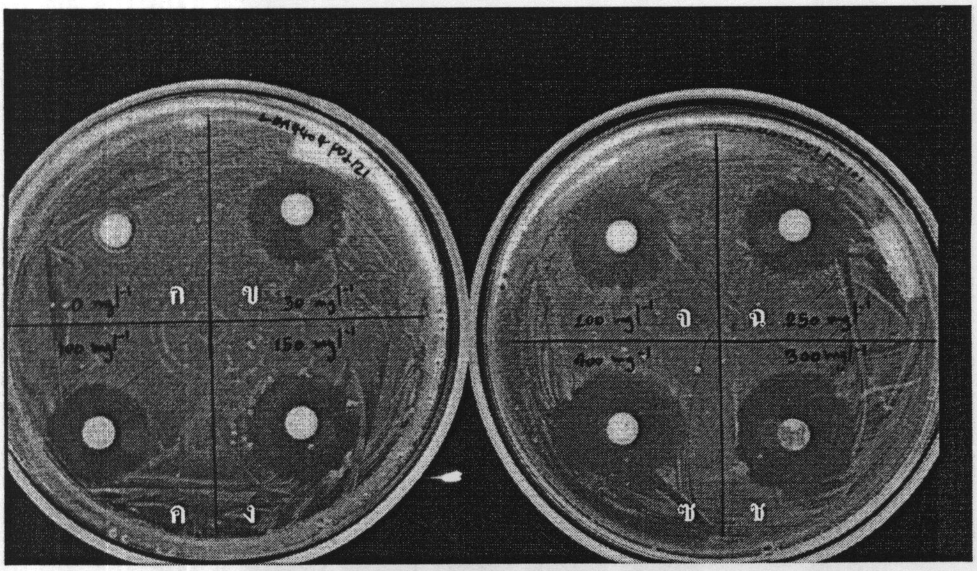
นำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินมาแกะเปลือก ล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอกและน้ำสะอาด แช่เมล็ดข้าวในเอทานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ 2%(w/v) และ Tween-20 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาทีต่อครั้ง โดยเขย่าขวดเป็นครั้งคราว ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v) และผงวุ้น 0.8%(w/v) และกานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25°ซ. ความเข้มแสง 1000 ลักซ์, 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 4.1 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซินลินต่อการเจริญของ *A. tumefaciens*

จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) พบว่า ภายหลังนำ *A. tumefaciens* บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลาข้ามคืน *A. tumefaciens* สามารถเจริญบนอาหารได้ และทำให้อาหารมีลักษณะเป็นฝ้าขุ่น จากการสังเกตพบวงใสเกิดขึ้นรอบ ๆ กระดาษกรองที่วางในจานเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงผลในภาพที่ 20 โดยกระดาษกรองที่จุ่มซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้เกิดวงใสในจานเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) ที่มีระยะห่างจากขอบกระดาษกรองยาวเท่ากับ 5.00±0.24 และ 4.97±0.36 มม. ตามลำดับ วงใสมีความกว้างเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของซีโฟแทคซีมสูงขึ้น โดยวงใสในจานเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) มีระยะห่างจากขอบกระดาษกรองยาวที่สุดเท่ากับ 8.54±0.11 และ 8.57±0.27 มม. ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของซีโฟแทคซีมเท่ากับ 400 มก./ล. จากการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างความเข้มข้นของซีโฟแทคซีมทุกคู่ต่อการเกิดวงใสรอบกระดาษ-กรอง โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับบนคอลัมน์ชนิดเดียวกันด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกัน มีค่าทางสถิติแตกต่างกัน ดังแสดงผลในภาพที่ 21

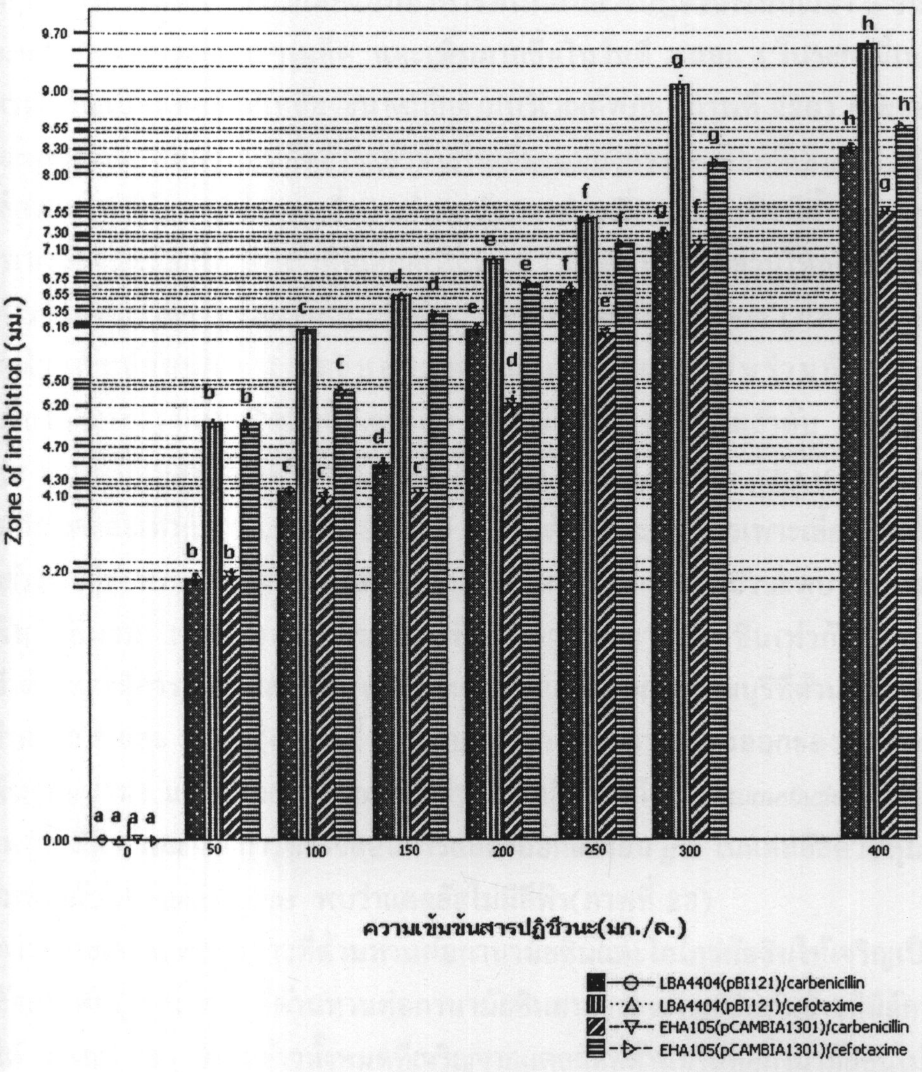
จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะคาบินิซิลินต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) พบว่ากระดาษกรองที่จุ่มคาบินิซินลินความเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้เกิดวงใสในจานเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) ที่มีระยะห่างจากขอบกระดาษกรองยาวเท่ากับ 3.10±0.18 และ 3.13±0.15 มม. ตามลำดับ และวงใสในจานเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) มีระยะห่างจากขอบกระดาษกรองยาวที่สุดเท่ากับ 8.30±0.16 และ 7.55± 0.21 มม. ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของคาบินิซินลินเท่ากับ 400 มก./ล. และจากการทดสอบอิทธิพลระหว่างความเข้มข้นของคาบินิซิลินทุกคู่ต่อการเกิดวงใสรอบกระดาษกรอง โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัย-สำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับบนคอลัมน์ชนิดเดียวกันด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันมีค่าทางสถิติแตกต่างกัน ดังแสดงผลในภาพที่ 21



ภาพที่ 20 ลักษณะวงใสที่เกิดขึ้นรอบกระดาษกรองซึ่งเกิดจากอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีม ความเข้มข้นต่าง ๆ บนจานเพาะเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121)

ก. 0 มก./ล. ข. 50 มก./ล. ค. 100 มก./ล. ง. 150 มก./ล.

จ. 200 มก./ล. ฉ. 250 มก./ล. ช. 300 มก./ล. ซ. 400 มก./ล.



ภาพที่ 21 แผนภูมิแสดงความยาวจากขอบกระดาษกรองถึงขอบของวงใสที่เกิดจากอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซินลินบนจานเพาะเชื้อ *A. tumefaciens*

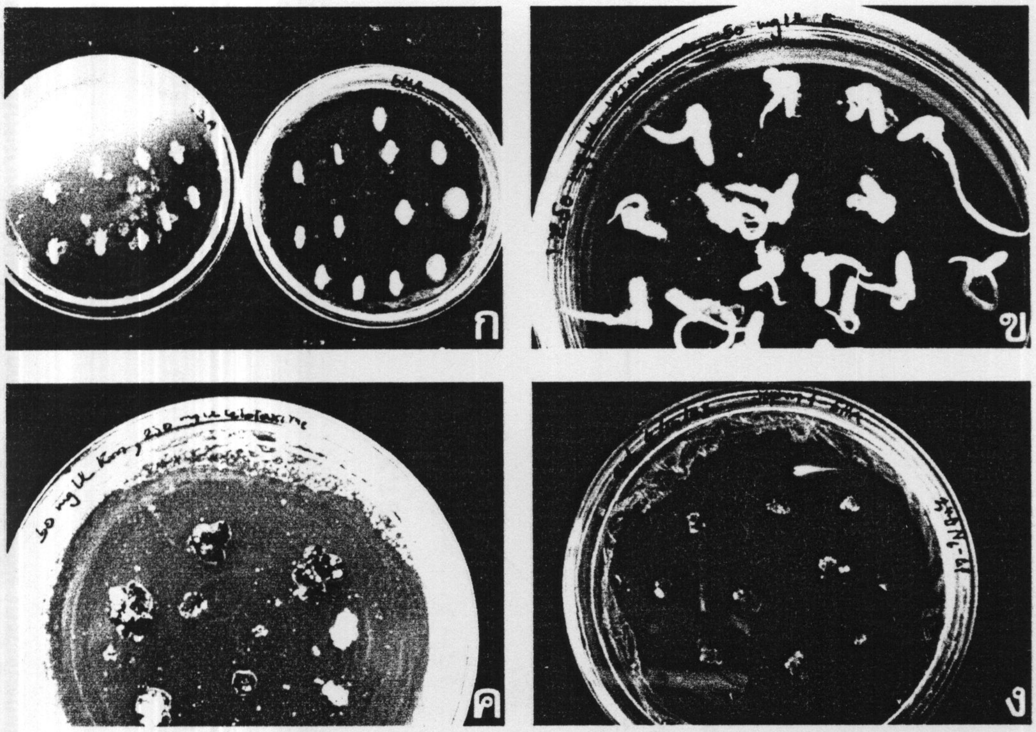
ผลการทดลองที่ 4.2 การส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีโดย *A. tumefaciens*

การส่งถ่ายยีนสู่เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ EHA105(pCAMBIA1301) พบว่าภายหลังการบ่มเมล็ดร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 60 นาที แล้วย้ายเมล็ดข้าวไปเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเป็นเวลา 2 วัน สังเกตพบ *A. tumefaciens* เจริญรอบ ๆเมล็ด และเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 3 และ 4 ในระยะนี้เมล็ดบางส่วนสามารถเจริญเป็นแคลลัสสีเหลืองขนาดเล็กจากบริเวณคัพภะ (ภาพที่ 22ก) ภายหลังการกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากเมล็ดข้าวแล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะพบว่าแคลลัสส่วนใหญ่ยังคงเพิ่มขนาดขึ้น แต่แคลลัสบางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 22ข) เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 1 เดือน แคลลัสส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นน้ำตาลและตาย แต่พบว่ามีแคลลัสบางส่วนเกิดขึ้นรอบ ๆก้อนแคลลัสเดิมที่ตาย (ภาพที่ 22ค และ 22ง) เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ผ่านการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) มีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 67.3 และ 74.6% ตามลำดับ ส่วนเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ผ่านการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA105(pCAMBIA1301) มีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 80.9 และ 82.7 % ตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะพบว่ามีการเกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 5.8 และ 3.7% ตามลำดับ และมีการเกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินเท่ากับ 2.8 และ 3.5% (ตารางที่ 2) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท1 และหอมสุพรรณบุรีที่ผ่านการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พบว่าแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีฟ้า และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พบว่าแคลลัสไม่มีสีฟ้า(ภาพที่ 23)

การเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวที่ต้านทานต่อกานามัยซินและไฮโกรมัยซินให้เจริญเป็นต้นพบว่าแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินสามารถเจริญเป็นต้นข้าวที่มีลักษณะสีเขียวปกติได้ (ภาพที่ 24) แต่ต้นข้าวทั้งหมดที่เจริญจากแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินไม่มีการเจริญของราก และสามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต(ภาพที่ 25) แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีการเกิดต้นข้าวที่ต้านทานต่อกานามัยซินเท่ากับ 3.2% ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* ในส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ ลำต้นและราก (ภาพที่ 26) จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวควบคุมไม่พบมีการแสดงออกของยีน *gus* ภายในรากและแผ่นใบ (ภาพที่ 27)

การตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น และตรวจสอบผลด้วย

เทคนิคอิเล็กโทรโฟเลซิสพบว่ามีชิ้นส่วนดีเอนเอขนาด 189 คู่เบส ใน lane ที่มีดีเอนเอสกัดจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินเป็นดีเอนเอต้นแบบ (ภาพที่ 28) และเมื่อนำต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินลงปลูกในดินกระถาง พบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์และออกรวงให้เมล็ดข้าวได้ (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 22 ก. ลักษณะเมล็ดข้าวภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 3 วัน

ข. ลักษณะแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน

ค. แคลลัสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน

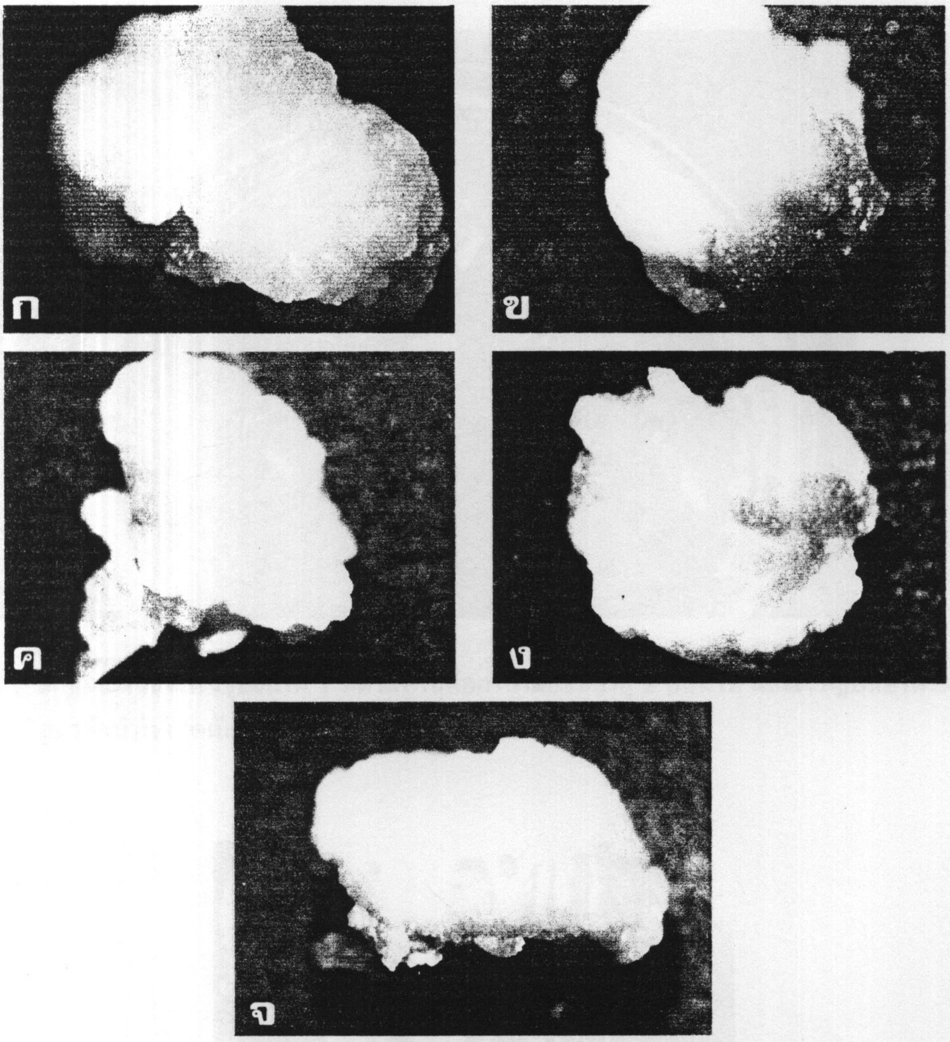
ง. แคลลัสของข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน

ตารางที่ 2 การเกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* และ transformation rate ในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี

A. tumefaciens strains	จำนวนเมล็ด	อัตราการเกิดแคลลัส*[1]	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการเกิดต้นที่ต้านทานต่อกานามัยซินและไฮโกรมัยซิน *[2]	
			แคลลัส(%)	ต้น(%)
LBA4404(pBI121)	256	67.3	5.8	3.2
	245	74.6	3.7	0
EHA105(pCAMBIA1301)	260	80.9	2.8	0
	272	82.7	3.5	0

*[1] อัตราการเกิดแคลลัสจดบันทึกภายหลังการบ่มเมล็ดร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 2 สัปดาห์

*[2] จำนวนแคลลัสหรือต้นที่เกิดต่อจำนวนเมล็ดที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens*×100



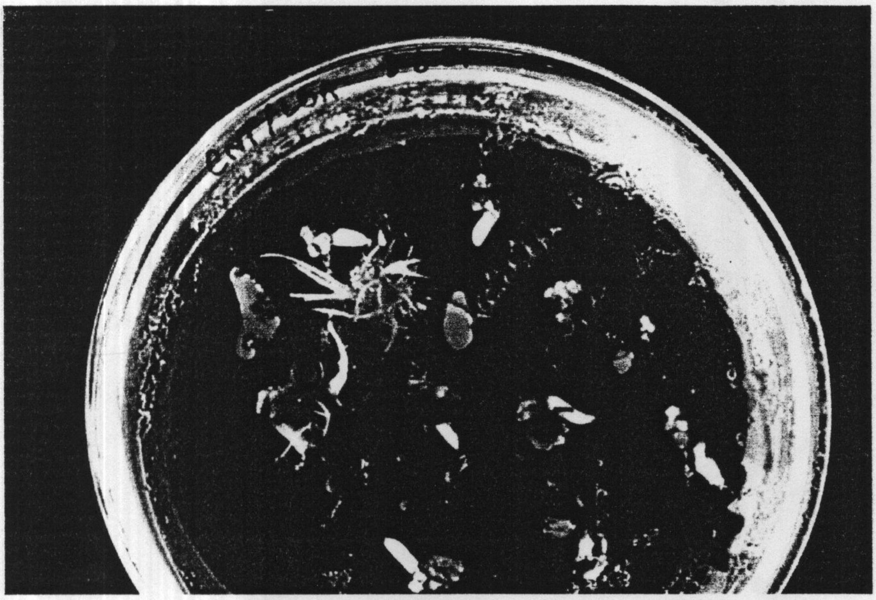
ภาพที่ 23 ก. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ไม่ได้บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens*

ข. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 pBI121 เป็นเวลา 5 วัน

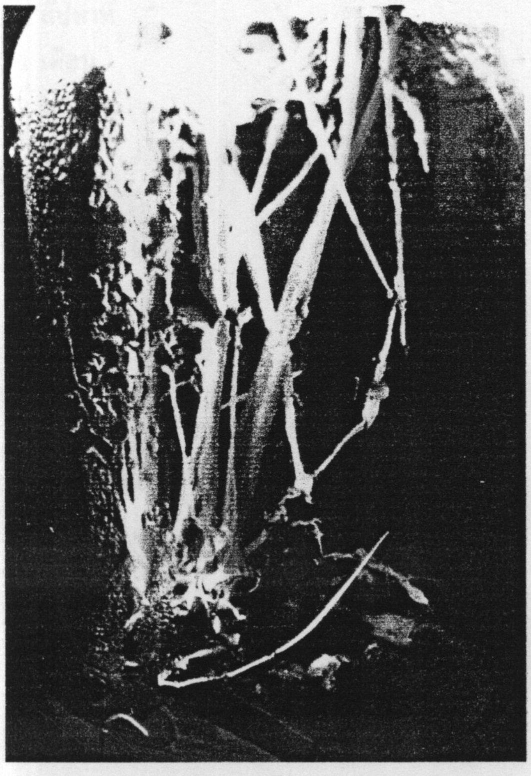
ค. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA105 pCAMBIA1301 เป็นเวลา 5 วัน

ง. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรี ภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 pBI121 เป็นเวลา 5 วัน

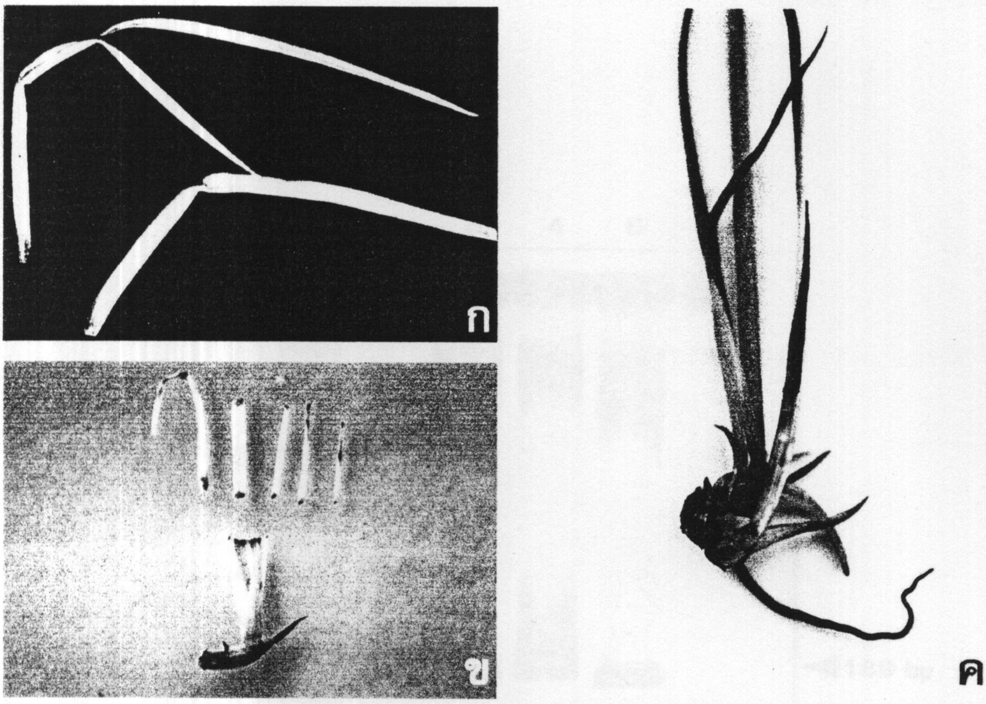
จ. ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมสุพรรณบุรี ภายหลังการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA105 pCAMBIA1301 เป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 24 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินอายุ 2 สัปดาห์ และเจริญบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล.



ภาพที่ 25 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 อายุ 45 วัน ที่ต้านทานต่อกานามัยซินและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล.

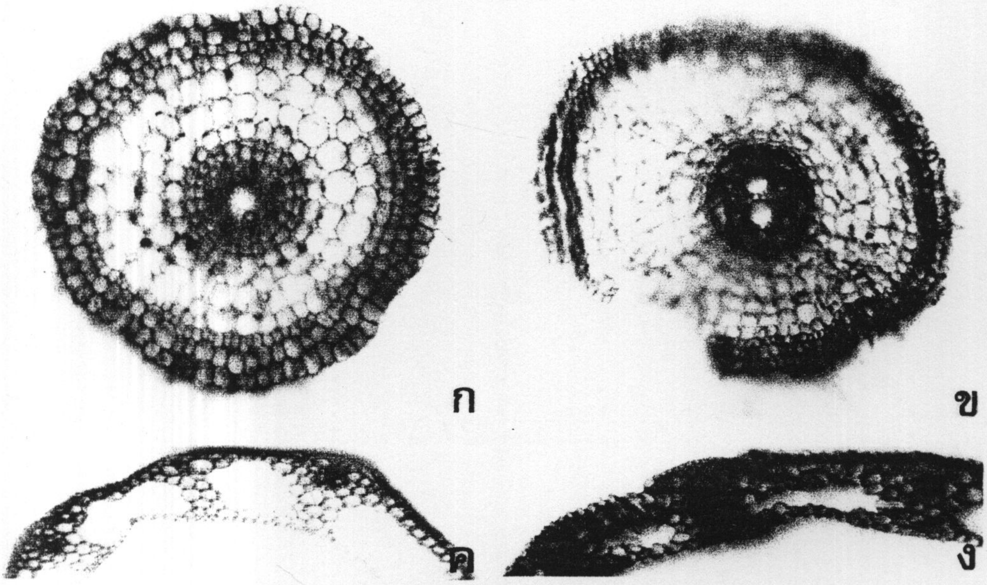


ภาพที่ 26 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน

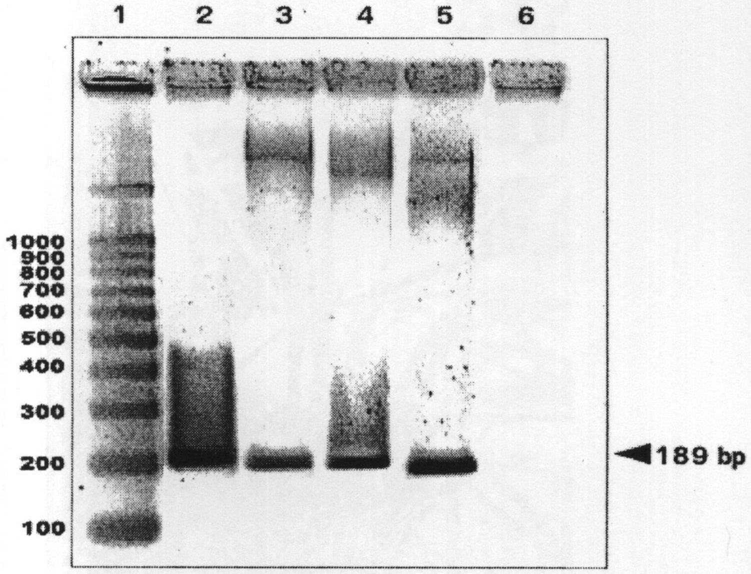
ก. ใบข้าวอายุ 2 สัปดาห์

ข. ต้นข้าวอายุ 2 สัปดาห์

ค. ต้นข้าวอายุ 1 เดือน



ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในรากและแผ่นใบของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน (ข และ ง) เปรียบเทียบกับรากและแผ่นใบของต้นข้าวควบคุม (ก และ ค)

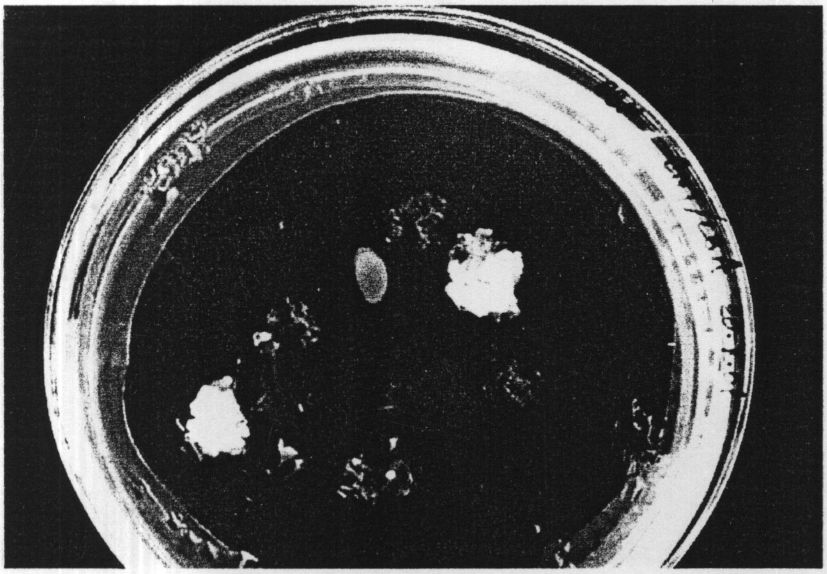


ภาพที่ 28 ผลการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น lane 1 : 100 bp, lane 2 : pCaMV35S, lane 3-5 : ดีเอนเอสกัดต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน, lane 6 : ดีเอนเอสกัดจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ (ชุดควบคุม)

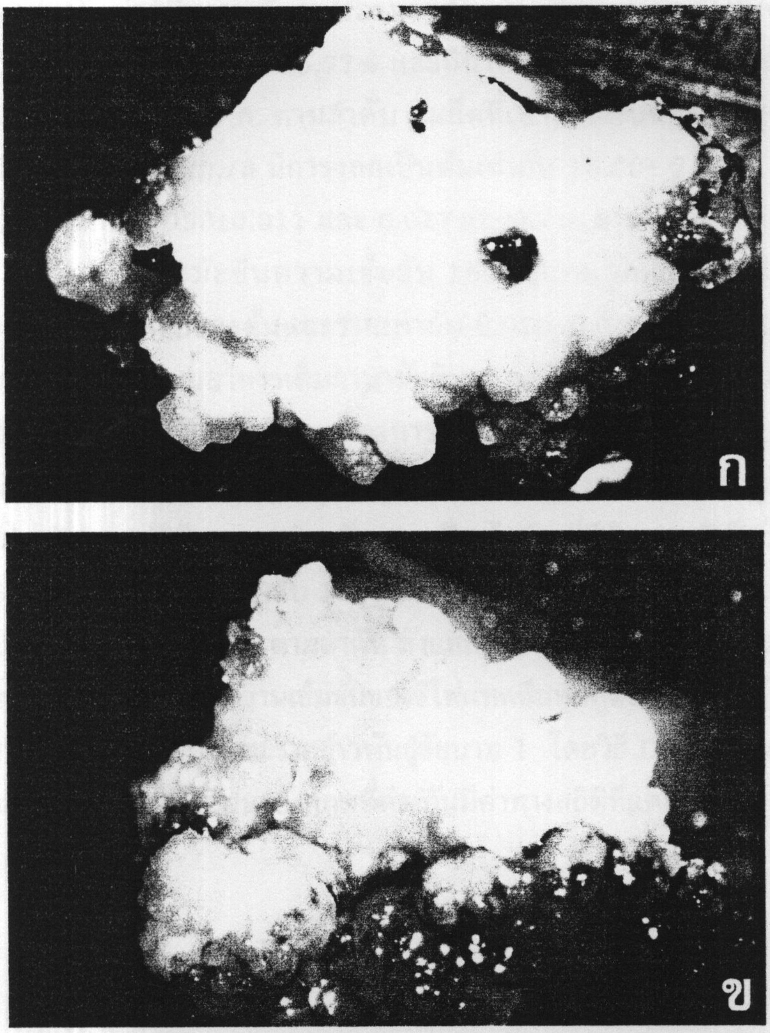
ภาพที่ 29 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินระยะออกรวง

ผลการทดลองที่ 4.3 การส่งถ่ายยีนโดยวิธียิงกระสุน

จากการส่งถ่ายยีนโดยวิธียิงกระสุนทองคำขนาด 1 μm ที่เคลือบด้วยพลาสมิด pBI 121 เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี ด้วยเครื่อง Biolistic PDS1000/He,BIO-RAD (helium pressure 1,300 psi , vaccuum inches 28 , target distance 9 ซม.) แล้วนำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ พบว่าแคลลัสบางส่วนตายภายในเวลา 3 สัปดาห์ และแคลลัสบางส่วนสามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกและเพิ่มขนาดได้ (ภาพที่ 30) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท1 และหอมสุพรรณบุรีหลังการยิงเป็นเวลา 10 วันพบว่า แคลลัสมีจุดสีฟ้า(ภาพที่ 31) และเมื่อย้ายแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นพบว่าแคลลัสไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้



ภาพที่ 30 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 หลังจากยิงด้วยกระสุนที่เคลือบด้วยพลาสมิด pBI121 และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซิน 50 มก./ล.

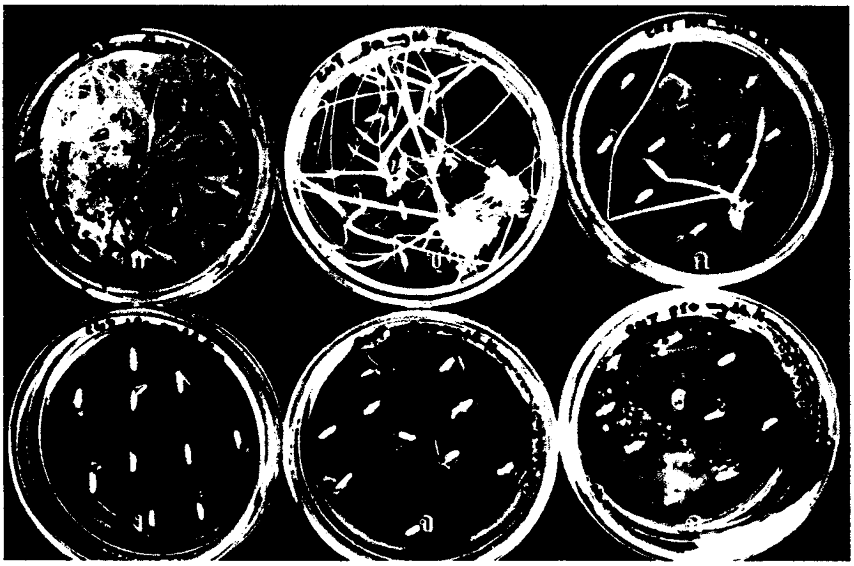


ภาพที่ 31 ผลการตรวจสอบกิจกรรมของยีน *gus* ในแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท1 (ก) และ หอมสุพรรณบุรี(ข) ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน pBI121 ด้วยวิธียิงกระสุน

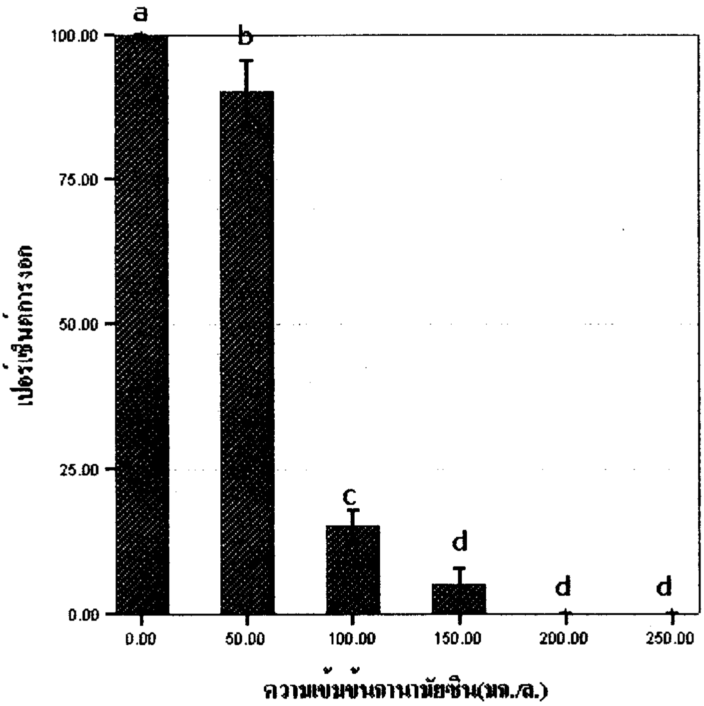
ผลการทดลองที่ 4.4 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 พบว่าเมล็ดข้าวมีอัตราการงอก รวมทั้งน้ำหนักสดเฉลี่ยของใบและรากลดลงเมื่อความเข้มข้นของกานามัยซินเพิ่มขึ้น โดยเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. มีการงอกเป็นต้นเท่ากับ 90±5.77% และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากเท่ากับ 0.268±0.015 และ 0.067±0.004 ก. ตามลำดับ เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 100 มก./ล มีการงอกเป็นต้นเท่ากับ 15.00± 2.88% มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากเท่ากับ 0.058±0.011 และ 0.017±0.003 ก. ตามลำดับ เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 150 มก./ล. มีการงอกเป็นต้นเท่ากับ 5.00±2.88% มีน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากเท่ากับ 0.020±0.001 และ 0.0019±0.0009 ก. ตามลำดับ โดยต้นข้าวที่งอกบนอาหารเติมกานามัยซินความเข้มข้น 50, 100 และ 150 มก./ล. มีลักษณะสีขาว ส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม กานามัยซินความเข้มข้น 200 และ 250 มก./ล. ไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะพบว่าเมล็ดงอกเป็นต้นข้าวที่มีลักษณะสีเขียวปกติ ภายในเวลา 3-4 วัน และมีการงอกเป็นต้นเท่ากับ 100% และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากเท่ากับ 0.372±0.016 และ 0.187± 0.019 ก. ตามลำดับ ดังแสดงผลในภาพที่ 32, 33 และ 34

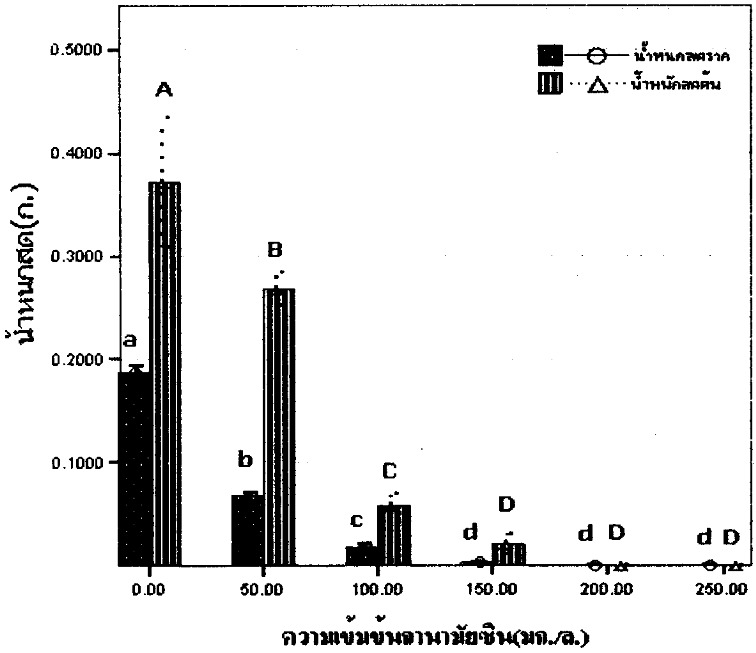
จากการทดสอบอิทธิพลระหว่างความเข้มข้นของซีโฟแทคซีมทุกคู่ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว รวมทั้งน้ำหนักสดเฉลี่ยต้นและรากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันมีค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 32 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่างๆ (ก. 0 มก./ล., ข. 50 มก./ล., ค. 100 มก./ล., ง. 150 มก./ล., จ. 200 มก./ล.)



ภาพที่ 33 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ



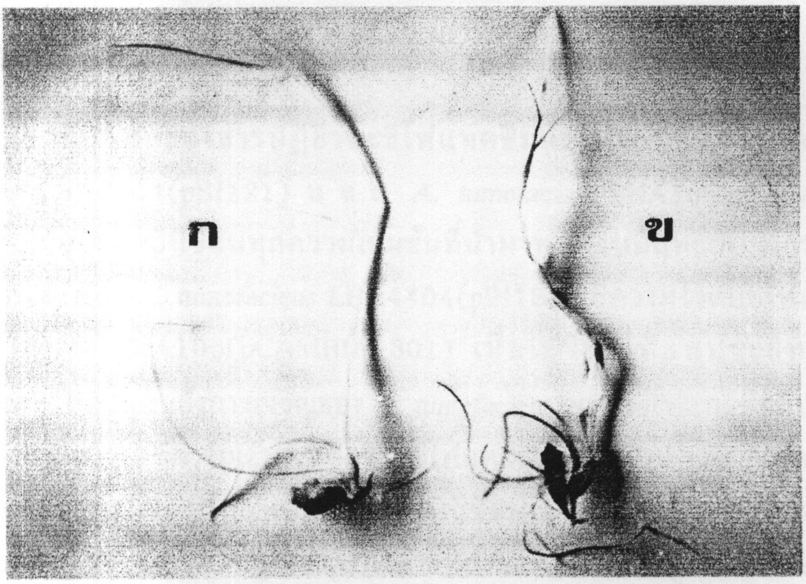
ภาพที่ 34 แผนภูมิแสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ

ผลการทดลองที่ 4.5 การศึกษาอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานต่อกานามัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานต่อกานามัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นเวลา 3-4 วัน เมล็ดข้าวสามารถเจริญเป็นต้นที่มีลักษณะสีเขียวปกติ แต่เมล็ดบางส่วนเจริญเป็นต้นที่มีลักษณะสีขาว การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ(ชุดควบคุม) บนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. พบว่าเมล็ดข้าวงอกเป็นต้นที่มีลักษณะสีขาวทั้งหมด ดังแสดงผลในภาพที่ 35

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างจำนวนเมล็ดข้าวที่ต้านทานต่อกานามัยซินต่อจำนวนเมล็ดข้าวที่ไม่ต้านทานต่อกานามัยซิน (segregation pattern) ในเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินรหัส CNT-NPT1 และ CNT-NPT2 พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 3:1 ($p<0.05$) ดังแสดงผลในตารางที่ 2 และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวรุ่นลูกที่งอกเป็นต้นสีเขียวทั้งหมดบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. พบว่าทุกต้นมีสีฟ้า (ภาพที่ 36)

ภาพที่ 35 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล.



ภาพที่ 36 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ(ชุดควบคุม) (ก) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ ที่งอกบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. (ข)

ตารางที่ 3 Segregation pattern ในเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน

รหัสพืช	จำนวนเมล็ดที่ทดสอบ	อัตราส่วนระหว่าง R/S	χ^2	ρ
CNT-NPT1	44	1:1	0.091	0.763
CNT-NPT2	35	1:1	0.725	0.395

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ *A. tumefaciens* EHA105(pCAMBIA1301) พบว่าซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* ได้ และ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) มีความไวต่อซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินมากกว่า EHA105(pCAMBIA1301) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะทั้งสองในการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* พบว่าซีโฟแทคซีมมีประสิทธิภาพสูงกว่าคาบินิซิลิน เนื่องจากที่ความเข้มข้นเดียวกันซีโฟแทคซีมทำให้เกิดพื้นที่ยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* ได้มากกว่า ซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินเป็นสารปฏิชีวนะที่ปัจจุบันนิยมใช้สำหรับกำจัด *A. tumefaciens* เป็นปฏิชีวนะประเภทเบต้าแลคแทม จัดอยู่ในกลุ่มเซฟาโลสปอร์-รินส์ สามารถจับกับ pennicillin-binding proteins ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสร้าง peptidoglycan และทำให้แบคทีเรียตายเนื่องจากเกิดการสลายของผนังเซลล์(cell wall lysis) (สุวณี สุภเวชย์และมาลัย วรจิตร, 2536) Shackelford and Chlan (1996) ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะ 10 ชนิด ได้แก่ ซีโฟแทคซีม คาบินิซิลิน อิริโธมัยซิน สเปคติโนมัยซิน โพลิมิซินบี คลอแรมเฟนิคอล เมธิซิลิน augmentin500 augmentin250 และ moxalactam ต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* LBA4404 และ EHA101 และรายงานว่า ซีโฟแทคซีมและ moxalactam มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* LBA4404 และ EHA101 ตามลำดับ Lin *et al.*(1995) ศึกษาผลของซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* LBA4404, C58 และ EHA101 ในอาหาร YM broth และรายงานว่าอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลินความเข้มข้น 50 µg/ml มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในยับยั้งการเจริญของ C58 และ EHA101 และอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 5 µg/ml และคาบินิซิลินความเข้มข้น 10 µg/ml ยับยั้งการเจริญของ LBA4404 ได้ Nauerby *et al.*(1997) ทดสอบการเจริญของ *A. tumefaciens* GU3101(pMP90)(pMRK12) และ C58(pGU3850) บนอาหารสูตร MS ที่เติมซีโฟแทคซีม คาบินิซิลิน และไทเมนทิน(timentin) และพบว่าอาหารที่เติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 500 มก./ล. คาบินิซิลินความเข้มข้น 1000 มก./ล. และไทเมนทินความเข้มข้น 150 มก./ล. มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* Cheng *et al.*(1998) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ติดเชื้อ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ EHA105(pBI121) บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมไทเมนทินความเข้มข้นต่างๆ และรายงานว่าไม่พบมีการติดเชื้อในเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ผ่านการย้ายลงอาหารใหม่ (sub-culture) 3 ครั้ง บนอาหารที่เติมไทเมนทินความเข้มข้น 500 มก./ล. อาหารที่เติมไทเมนทินความเข้มข้น 500 มก./ล. ร่วมกับคาบินิซิลิน 250 มก./ล. และเสนอว่าไทเมนทินมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

การเจริญของ *A. tumefaciens* เทียบเท่ากับซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลิน แต่มีผลเสียต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของยาสูบน้อยกว่าซีโฟแทคซีมและคาบินิซิลิน

ในการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *A. tumefaciens* ขั้นตอนภายหลังการ co-cultivation เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชติดเชื้อ *A. tumefaciens* คือการนำเนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อกำจัด *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากการปนเปื้อนของ *A. tumefaciens* ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้อัตราการเกิดต้นและรากของพืชลดลงและทำให้พืชตายได้ แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อกำจัด *A. tumefaciens* อาจมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืชได้เช่นกัน (Dodds and Robert, 1981) ดังนั้นจึงควรคำนึงถึงอิทธิพลของสารปฏิชีวนะนั้นต่อการเจริญของพืชเป้าหมายด้วย ในการศึกษาบทที่ 3 การทดลองที่ 3.4 ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมต่อการเจริญเป็นต้นของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นพืชเป้าหมายสำหรับการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* และพบว่าซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 250 มก./ล. เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีผลยับยั้งการเจริญเป็นต้นของแคลลัสข้าว และจากผลการทดลองในบทนี้พบว่าซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 250 มก./ล. มียับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ EHA105(pCAMBIA1301)ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน ดังนั้นการเติมซีโฟแทคซีมความเข้มข้น 250 มก./ล. ในอาหารคัดเลือกเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกำจัด *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ EHA105(pCAMBIA1301) โดยมีผลเสียหายต่อการเกิดต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 น้อยที่สุด

จากการศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี โดย *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ EHA105(pCAMBIA1301) พบว่าสามารถสร้างแคลลัสข้าวที่ต้านทานต่อกานามัยซินและไฮโกรมัยซิน และแคลลัสพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินเจริญเป็นต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินได้ โดยไม่ต้องใช้สารชักนำยีน *vir* (*vir* inducer) Vijayachanda *et al.* รายงานว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากเนื้อเยื่อ scutellum ของเมล็ดข้าว และเนื้อเยื่อ scutellum ของต้นกล้าข้าวอายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D กระตุ้นการแสดงออกของยีน *vir E* ได้ นอกจากนี้ยังมีส่วนในการสร้าง T-strand ใน *A. tumefaciens* ด้วย และเสนอว่าเนื้อเยื่อ scutellum และแคลลัสข้าวที่เกิดจากเนื้อเยื่อ scutellum เป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายยีน ดังนั้นจึงผู้ทำการทดลองจึงตั้งสมมติฐานว่าเนื้อเยื่อ scutellum ของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี อาจมีสารชักนำยีน *vir* เช่นกัน อย่างไรก็ตาม Azhakanandam *et al.* (2000) ศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Taipei309, Tinamen และ Pusa Basmatil โดย *A. tumefaciens* ได้รายงานว่าภายหลังการ co-cultivation แคลลัสข้าวร่วมกับ *A. tumefaciens* โดยไม่ใช้สารชักนำยีน *vir* ทำให้ไม่พบมีการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสข้าว ถึงแม้ว่า *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นสายพันธุ์แบบ super-virulent ก็ตาม มีรายงานการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวและธัญพืชจำนวนมากใช้สาร

ชักนำยีน *vir* กระตุ้นการแสดงออกของยีน *vir* ใน *A. tumefaciens* ก่อนนำไปเป็นตัวกลางส่งถ่ายยีนสู่พืช เช่น acetosynringone และ potato suspension

การศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนโดยมีเมล็ดข้าวเป็นเป้าหมายในการส่งถ่ายยีนเช่นเดียวกับการศึกษาของ Aldemita and Hodge(1996) ซึ่งรายงานการนำคัพภะอ่อนของข้าวจาโปนิกาพันธุ์ Radon และข้าวอินดิคาพันธุ์ IR72 และพันธุ์ TCS10 บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวจาโปนิกาและข้าวอินดิคาเท่ากับ 27% และ 1-5% ตามลำดับ มีรายงานความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของข้าว เช่น แคลลัส(Hiei *et al.*, 1994; Lucca *et al.*, 2001) และปลายยอด(shoot apex)(Park *et al.*, 1996)

อาหารที่ใช้ในขั้นตอนการ co-cultivation เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีร่วมกับ *A. tumefaciens* ในการศึกษาครั้งนี้คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2%(w/v), 2,4-D ความเข้มข้น 22.5 μM, เคซีนไฮโดรไลเสทความเข้มข้น 300 มก./ล. และผงวุ้น 0.8%(w/v) (pH 5.7) และบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. สภาวะของการบ่มเนื้อเยื่อร่วมกับ *A. tumefaciens* ครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Hiei *et al.*(1994) ซึ่งรายงานว่าการบ่มแคลลัสข้าวที่ชักนำให้เกิดจากเนื้อเยื่อ scutellum ร่วมกับ *A. tumefaciens* บนอาหารที่มี pH 4.8-6.2 ณ อุณหภูมิ 22-28°ซ. ทำให้แคลลัสมีการแสดงออกของยีน *gus* สูง และเสนอว่าอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซทเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเนื้อเยื่อข้าวร่วมกับ *A. tumefaciens* มีรายงานความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ที่สภาวะอุณหภูมิแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้โดย Alt-Morbe *et al.*(1989) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับชักนำการแสดงออกของยีน *virG* และ *virD* ใน *A. tumefaciens* และรายงานว่าอุณหภูมิต่ำกว่า 28°ซ. ทำให้ยีน *virG* มีการแสดงออกได้ดี แต่การ co-cultivation ที่อุณหภูมิสูงยับยั้งการแสดงออกของยีน *virG* Salas *et al.*(2001) รายงานว่าการบ่มเนื้อเยื่อใบยาสูบร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ทำให้เนื้อเยื่อพืชตอบสนองต่อ *A. tumefaciens* มากขึ้น และทำให้การสอดแทรกของ T-DNA ในจีโนมยาสูบมีความเสถียรมากขึ้นด้วย

สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ LBA4404(pBI121) และ EHA105(pCAMBIA1301) ซึ่งเป็นเวกเตอร์แบบ binary vector ซึ่ง Chan *et al.* (1992) รายงานความสำเร็จในการใช้ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) ส่งถ่ายยีนต้านทานต่อกานามัยซินเข้าสู่ข้าวอินดิกาพันธุ์ Taichung Native1 และสามารถสร้างแคลลัสข้าวที่ต้านทานต่อกานามัยซินได้ ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนรายงานของ Datta *et al.*(2000) ซึ่งรายงานการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Basmati122 และ Tulsi ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน *A. tumefaciens* LBA4404(pNO1) และชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ และเสนอว่าไม่มีความจำเป็นในการใช้สายพันธุ์ *A. tumefaciens* แบบ supervirulent strain ในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าว Cheng *et al.*(1998) ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน *cryIA* และ *cryIB* เข้าสู่ข้าวโดย

A. tumefaciens LBA4404(pKUB) และ EHA105(pKUC) (pKUB) และต้นข้าวแปลงพันธุ์มีลักษณะต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชได้

เวคเตอร์ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนครั้งนี้มี CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนคัดเลือก (*nptII* และ *hptII*) และยีนรายงานผล (*gus*) CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในพืชส่วนใหญ่ และนำมาใช้เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายสู่ข้าวและธัญพืชหลายชนิด ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์แสดงให้เห็นว่า CaMV35S ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สนใจในแคลลัสและต้นข้าวแปลงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hiei *et al.*(1994) ที่รายงานว่า CaMV35S ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สนใจในข้าวแปลงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Chan *et al.*(1992), Dong *et al.*(1996), Park *et al.*(1996) และ Cheng *et al.*(1998) รายงานความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวโดย *A. tumefaciens* โดยมีโปรโมเตอร์ CaMV35S ควบคุมการแสดงออกของยีนคัดเลือกและยีนรายงานผล

ผลการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เมล็ดข้าวโดย *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) และ EHA105(pCAMBIA1301) พบว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรี ที่ผ่านการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) มีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 67.3 และ 74.6% ตามลำดับ และเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ผ่านการบ่มร่วมกับ EHA105(pCAMBIA1301) มีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 80.6 และ 82.7% ตามลำดับ การเกิดแคลลัสจากเมล็ดดังกล่าวมีค่าลดลงจากการเกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวปกติที่ไม่ติดเชื้อ *A. tumefaciens* (ผลการทดลองที่ 3.2) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการบ่มเมล็ดข้าวร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งในระยะเวลาดังกล่าวแบคทีเรียอาจทำให้สร้างความเสียหายให้แก่เนื้อเยื่อเจริญและส่งผลให้เมล็ดมีอัตราการเกิดแคลลัสลดลง แต่อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้สามารถคัดเลือกแคลลัสและต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินและไฮโกรมัยซินบนอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการเกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อกานามัยซินมีค่าเท่ากับ 5.8 และ 3.7% ตามลำดับ และการเกิดแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินมีค่าเท่ากับ 2.8 และ 3.5% ตามลำดับ แต่มีเพียงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินที่สามารถเจริญเป็นต้นได้ และมีการเกิดต้นเท่ากับ 3.2% โดยต้นข้าวแปลงพันธุ์ทั้งหมดมีลักษณะสีเขียวปกติ Ayes and Park (1994) รายงานว่าแคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินส่วนใหญ่เจริญเป็นต้นที่มีลักษณะเผือก เช่นเดียวกับ ทศพร พิพัฒน์ภานุกูล(2542) ที่รายงานการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ กข6 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินให้เกิดต้นบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. โดยต้นข้าวแปลงพันธุ์ส่วนใหญ่มีลักษณะเผือก และต้นข้าวเผือกดังกล่าวมีการแสดงออกของยีน *gus*

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซินแบบสุ่มตัวอย่างตามวิธีทางสถิติ พบว่าทุกต้นที่นำมาตรวจสอบมีการแสดงออกของยีน *gus* ในลำต้น ใบ และราก โดยไม่พบมีพืช escape จึงอาจกล่าวได้ว่ายีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพสำหรับการส่งถ่ายยีนในข้าว ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Hauptmann *et al.*(1988) ที่รายงานว่าสารปฏิชีนวะกานามัยซินไม่เหมาะสมใช้เป็น selective agent สำหรับการคัดเลือกแคลลัสข้าวแปลงพันธุ์ เนื่องจากแคลลัสข้าวมีความต้านทานตามธรรมชาติต่อกานามัยซินได้ในปริมาณสูง มีรายงานการความสำเร็จในการใช้กานามัยซินเป็น selective agent สำหรับการส่งถ่ายยีนในธัญพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด (Gould *et al.*, 1991; Lyznik *et al.*, 1989), ข้าวสาลี (Hauptmann *et al.*, 1988) และข้าว (Dekeyser *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1992)

การตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น และดีเอนเอสกัดจากใบข้าวเป็นดีเอนเอต้นแบบพบว่ามีดีเอนเอขนาด 189 bp ในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ดังนั้นจึงมีการสอดแทรกของ CaMV35S ในจีโนมของข้าวทุกต้นที่นำมาทดสอบ การนำต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินลงปลูกพบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์สามารถเจริญเติบโตและออกรวงให้ผลผลิตรุ่นลูก(T_1)ได้

ผลการทดสอบอิทธิพลของกานามัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 พบว่าอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%, ผงวุ้น 0.8% ร่วมกับกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. เป็นอาหารคัดเลือกที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน เนื่องจากกานามัยซินที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีผลทำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติเจริญเป็นต้นที่มีลักษณะสีขาว ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างจากต้นข้าวที่เจริญบนอาหารที่ไม่เติมกานามัยซินอย่างชัดเจน การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินบนอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. พบว่าเมล็ดข้าวมีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานต่อกานามัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานต่อกานามัยซิน เท่ากับ 1:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ตรงตามกฎของเมนเดลและแสดงให้เห็นว่ามีการถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อกานามัยซินจากต้นพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูกได้ รวมทั้งอธิบายได้ว่าการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมข้าวเกิดขึ้น ณ ตำแหน่งโลคัสเดียว(single locus) Dai *et al.*(2001) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวรุ่นลูกของข้าวพันธุ์ Taipei309 แปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *codA* โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม 5-FU และพบมีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานต่อ 5-FU ต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานต่อ 5-FU เท่ากับ 3:1

บทที่ 5
การศึกษาเซลพันธุศาสตร์ สรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา ในข้าวแปลงพันธุ์

บทนำ

ในการศึกษาวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ผู้ทำการทดลองสามารถส่งถ่ายยีนต้านทานต่อไฮโกรมัยซินเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์โดย *A. tumefaciens* และชักนำให้แคลลัสนั้นเจริญเป็นต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินได้ และเพื่อให้กระบวนการศึกษาการส่งถ่ายยีนมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น จึงออกแบบการทดลองให้นำต้นข้าวพันธุ์ กข 6 แปลง-พันธุ์ ดังกล่าวลงปลูกเพื่อศึกษาลักษณะทางเซลพันธุศาสตร์ สรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาในต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_0 T_1 และ T_2 เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ และยืนยันการสอดแทรกของ T-DNA ใน จีโนมข้าวรุ่น T_0 T_1 และ T_2 ด้วยเทคนิค PCR นอกจากนี้ยังศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อไฮโกรมัยซินไปสู่รุ่น T_1 และ T_2 อีกด้วย โดยคาดว่าการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ในอนาคตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 5.1 การนำข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินลงปลูก

นำต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และมีการเจริญของต้นและรากที่สมบูรณ์ออกจากขวดทดลอง ล้างอาหารวุ้นออกจากรากด้วยน้ำสะอาด แล้วผึ่งให้แห้งเล็ก-น้อย นำต้นข้าวลงปลูกในกระถางดิน โดยจัดวางกระถางให้อยู่ในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จนกระทั่งต้นข้าวตั้งตัวได้จึงย้ายไปไว้ในเรือนเพาะชำที่มีแสงแดดส่องถึงทั้งวัน ปลูกต้นข้าวต่อไปจนกระทั่งออกรวง และเก็บเมล็ดข้าวรุ่นลูกไว้สำหรับปลูกในปีถัดไป ดังแสดงในภาพที่ 37

5.1.1 <u>การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี *gus* assay</u>

นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งได้แก่ เมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ แคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ และใบข้าวแปลงพันธุ์ มาซับด้วยกระดาษกรองให้แห้ง นำใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์แล้วเติม X-gluc assay buffer ให้ท่วมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับใบข้าวให้นำแช่ในเอทานอล 95%(v/v) จนกระทั่งไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์จึงตรวจสอบสีของเนื้อเยื่อ

5.1.2 <u>การตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR</u>

นำใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ และต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติมาสกัดดีเอนเอด้วยวิธี CTAB method เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการตรวจสอบและดีเอนเอเริ่มต้นที่ใช้

สำหรับการทำ PCR คือ CaMV35S(5′-GCTCCTACAAATGCCATCA-3′และ 5′-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3′) สภาวะของการทำ PCR คือ pre-denaturation ที่ 94°ซ./3 นาที จำนวน 1 รอบ; denaturation 94°ซ./20 วินาที, annealing ที่ 50°ซ./40 วินาที, extension 72°ซ./60 วินาที จำนวนรอบ 40 รอบ; final extension 72°ซ./3 นาที จำนวน 1 รอบ และ cooling phase 4°ซ./1 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

การทดลองที่ 5.2 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 มาแกะเปลือก ล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอกและน้ำประปา แช่เมล็ดข้าวในเอทานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 2%(w/v) และ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาทีต่อครั้ง โดยเขย่าขวดเป็นครั้งคราว ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v), ผงวุ้น 0.8%(w/v) และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดจำนวน 45 เมล็ดต่อความเข้มข้น นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25°ซ. ความเข้มแสง 1000 ลักซ์, 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการงอก น้ำหนักสดต้นและราก

การทดลองที่ 5.3 การศึกษาอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และ T_1

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และ T_1 มาแกะเปลือก ล้างให้สะอาดด้วยผงซักฟอกและน้ำประปา แช่เมล็ดข้าวในเอทานอล 70%(v/v) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ 2%(w/v) และ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาทีต่อครั้ง โดยเขย่าขวดเป็นครั้งคราว ย้ายเมล็ดลงเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2%(w/v) และผงวุ้น 0.8%(w/v) และไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 20 มก./ล. นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25°ซ. ความเข้มแสง 1000 ลักซ์, 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 5.4 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติและข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์

5.4.1 <u>การวัดค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบ</u>

นำเนื้อเยื่อใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ และข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์แช่แข็งมาบด ตัวอย่างละ 1 ก. จากนั้นนำน้ำคั้นที่ได้ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนปริมาตร 0.15 มล. ไปวัดค่าศักย์ออสโมซิสด้วยเครื่อง osmometer (automatic semi-micro osmometer รุ่น A0300 version 0291) มีหน่วยเป็น m Osmol/kg H_2O

5.4.2 <u>การหาปริมาณคลอโรฟิลล์</u>

นำใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ และใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ น้ำหนัก 1 ก. บดในโกร่งให้ละเอียด โดยขณะบดเติมอะซิโตน(acetone) ความเข้มข้น 80%(v/v) ปริมาณ 6 มล. ลงในโกร่ง จนกระทั่งสีเขียวของใบข้าวละลายออกมาหมด จากนั้นกรองเอากากใบออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เติมอะซิโตนความเข้มข้น 80%(v/v) ลงไปในสารละลายสีเขียวที่กรองได้ จนกระทั่งสารละลายมีปริมาตรครบ 10 มล. นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic20 ที่ 645 nm และ 663 nm ตามลำดับ โดยมีอะซิโตนความเข้มข้น 80%(v/v) เป็น blank และนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์จากสูตรคำนวณ

คลอโรฟิลล์เอ(mg/g tissue) $= [12.7(A663)-2.69(A645)] \times [V \div (1000 \times W)]$

คลอโรฟิลล์บี(mg/g tissue) $= [22.9(A645)-4.68(A663)] \times [V \div (1000 \times W)]$

คลอโรฟิลล์รวม(mg/g tissue) $= [20.2(A645)+8.02(A663)] \times [V \div (1000 \times W)]$

เมื่อ A663 = ค่าดูดกลืนแสงที่ 663 nm

A645 = ค่าดูดกลืนแสงที่ 645 nm

V = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย

W = น้ำหนักใบ

การทดลองที่ 5.5 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 และข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ และข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ ดังต่อไปนี้ ลักษณะต้นกล้าอายุ 4 วัน ความสูงเฉลี่ยต้นกล้าอายุ 10 วัน ความสูงเฉลี่ยต้นข้าวอายุ 3 เดือน ลักษณะใบธง(ความยาวเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ยต่อความกว้างเฉลี่ย) ลักษณะเมล็ด(ความยาวเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ยต่อความกว้างเฉลี่ย) และลักษณะรวงข้าว (จำนวนรวงต่อต้น จำนวนกิ่งปฐมภูมิ(primary branch)ต่อรวง จำนวนเมล็ดต่อรวง ความยาวรวง)

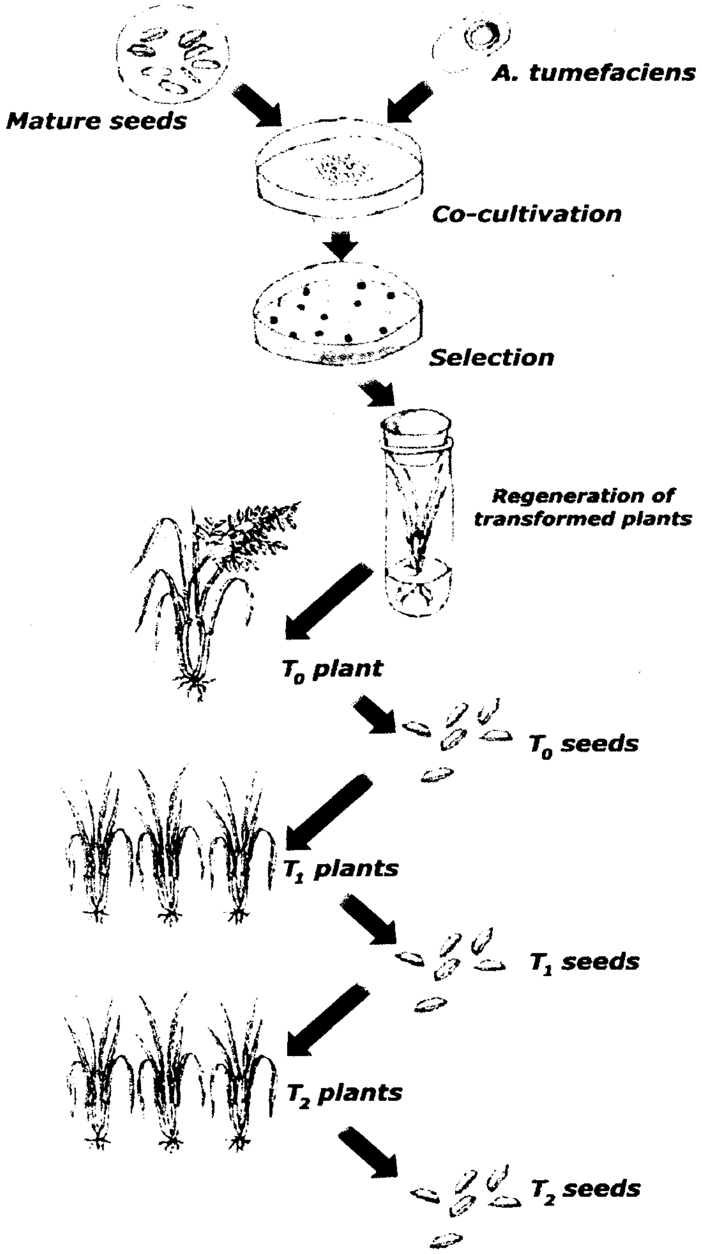
การทดลองที่ 5.6 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์

วางเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 และพันธุ์ชัยนาท 1 ในจานแก้วที่รองด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำ นำจานแก้วไปเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2-3 วัน จนกระทั่งมีรากงอกจากเมล็ด ใช้ใบมีดโกนตัดปลายรากยาว 1 ซม. แล้วนำไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ซับรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูแล้วนำแช่ในสาร pre-treatment 3 ชนิด ตามระยะเวลาและอุณหภูมิ ดังต่อไปนี้

Pre-treatment	ระยะเวลา	อุณหภูมิ
0.002 M 8-hygroxyquinoline	2.5 ชม.	28°ซ.
0.2% colchicine	4 ชม.	4°ซ.
1% α-bromonapthalene	2 ชม.	28°ซ.

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำปลายรากข้าวแช่ในน้ำกลั่น 2 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาทีต่อครั้ง เพื่อล้างสาร pre-treatment ซับปลายรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูแล้วนำไปแช่ในสารละลาย Carnoy's solution อีกเป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เมื่อครบกำหนดล้างรากข้าวด้วยเอทานอล 70%(v/v) ก่อนนำไปเก็บรักษาในเอทานอล 70%(v/v) ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เมื่อต้องการศึกษา นำล้างรากข้าวให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ตัดเฉพาะบริเวณปลายรากที่มีสีขาวขุ่นวางลงบนแผ่นสไลด์ หยด 1N HCl ให้ท่วมปลายรากแล้วนำไปผ่านเปลวไฟจนกระทั่งปลายรากอ่อนนุ่ม ขยี้ปลายรากด้วยปลายเข็มเขี่ย แล้วย้อมด้วยสี orcein เป็นเวลา 5 นาที ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟส

ศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายรากข้าวพันธุ์ กข6 ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินและปลายรากข้าวพันธุ์ชัยนาท1 ที่ต้านทานต่อกานามัยซินด้วยวิธีการดังกล่าวมาแล้ว และเปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมปลายรากข้าวพันธุ์ กข6 และพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ



ภาพที่ 37 แผนผังแสดงขั้นตอนการนำข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินลงปลูก

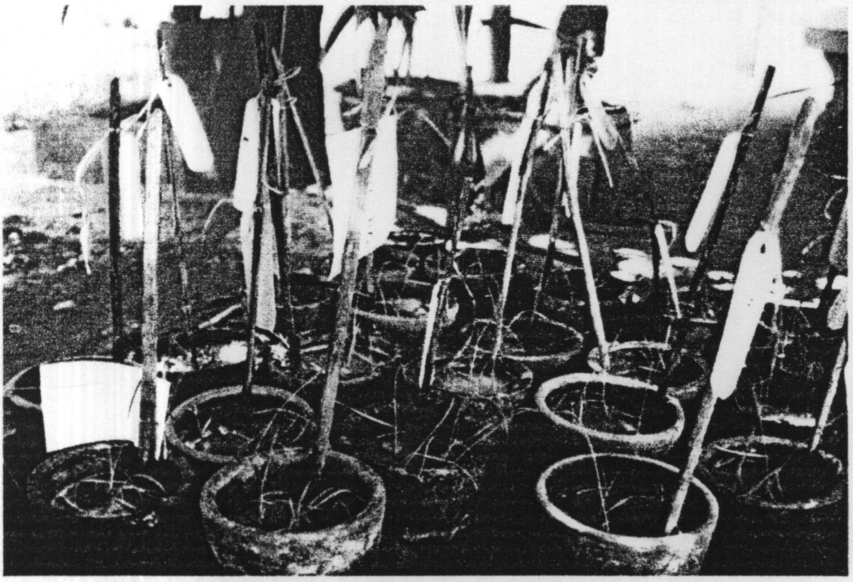
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 5.1 การนำข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินลงปลูก

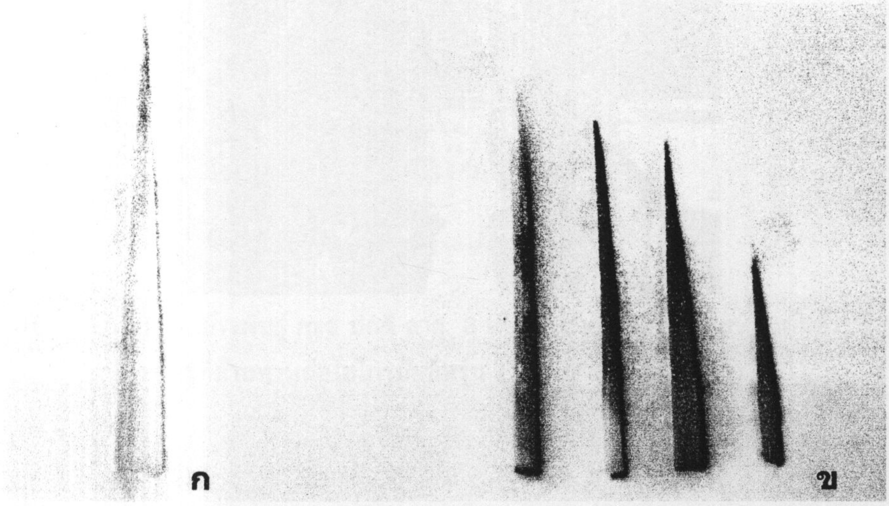
จากการนำข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินลงปลูกในดินกระถาง พบว่าต้นข้าวส่วนใหญ่มีชีวิตรอด และตั้งตัวได้เมื่อนำปลูกในที่ร่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 38) ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในใบข้าวรุ่น T_0 ที่นำลงปลูกพบว่าทุกใบมีสีฟ้า (ภาพที่ 39) ต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์สามารถเจริญเติบโตจนกระทั่งออกรวงให้ผลผลิตเช่นเดียวกับต้นข้าวปกติ ได้ดังแสดงผลในภาพที่ 40, 41 และ 42

ผลการนำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และ T_1 ลงปลูกพบว่าต้นข้าวเจริญเติบโตและออกรวงในระยะเวลาใกล้เคียงกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ภาพที่ 43 และ 44) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลง-พันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_0 และ T_1 พบว่าบริเวณคัพภะและเอนโดสเปิร์มของเมล็ดมีการแสดงออกของยีน *gus* (ภาพที่ 45, 46) และแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_0 และใบข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_1 มีการแสดงออกของยีน *gus* เช่นกัน (ภาพที่ 47 และ 48)

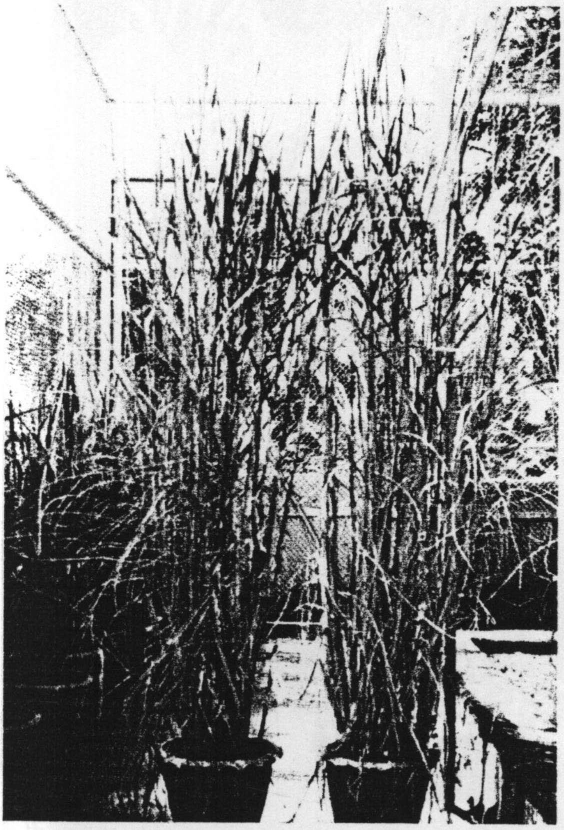
การตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากต้นข้าวรุ่น T_0 รหัส RD6-htp1, RD6-htp2, RD6-htp3, RD6-htp4, RD6-htp5, RD6-htp6, RD6-htp7, RD6-htp8 และ RD6-htp9 และดีเอนเอที่สกัดจากต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_1 รหัส RD6-htp2-3, RD6-htp3-3, RD6-htp4-5, RD6-htp5-1 รวมทั้งดีเอนเอที่สกัดจากต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_2 รหัส RD6-htp2-3-3, RD6-htp3-3-1, RD6-htp4-2-5, RD6-htp9-7-1 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่ามีดีเอนเอขนาด 189 คู่เบสในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ(ภาพที่ 49, 50 และ 51)



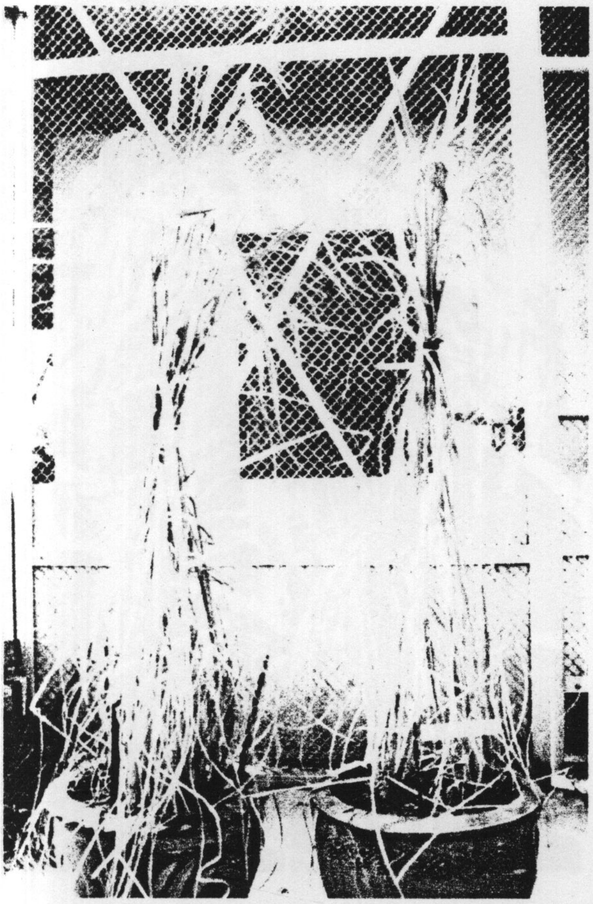
ภาพที่ 38 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 อายุ 1 เดือน เมื่อนำลงปลูกในดินกระถาง



ภาพที่ 39 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ก) และใบข้าวพันธุ์ กข6 ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 (ข)

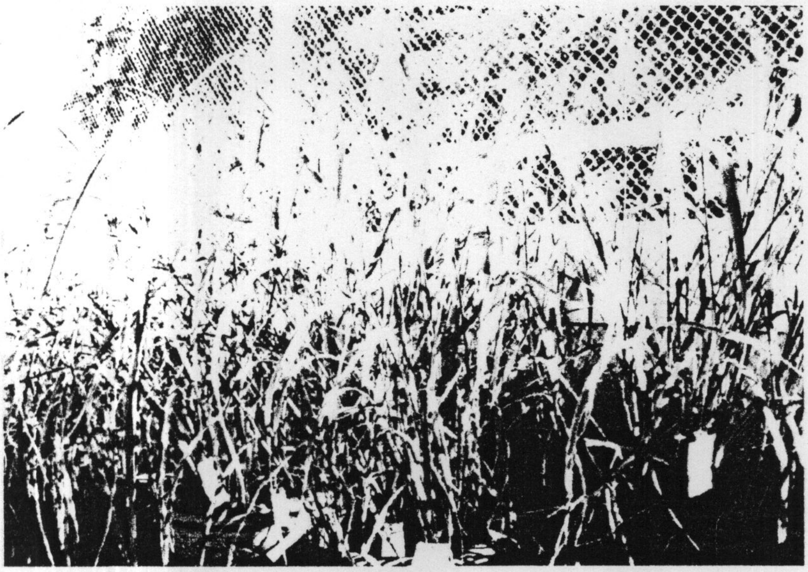


ภาพที่ 40 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ อายุ 3 เดือน (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 อายุ 3 เดือน (ขวา)



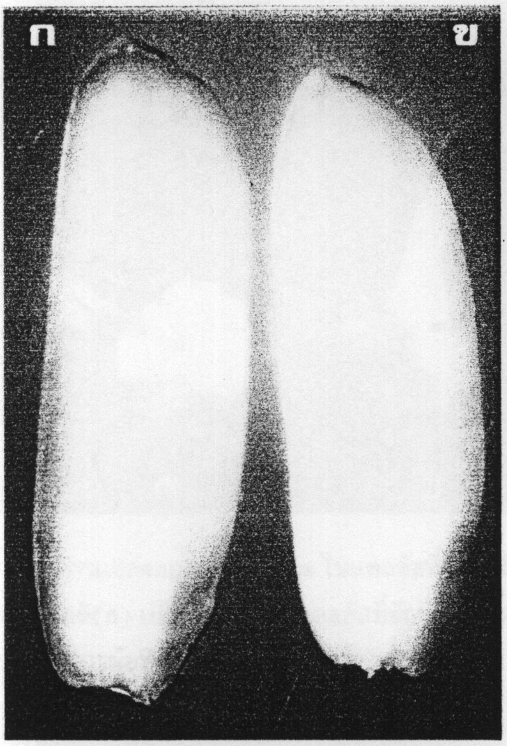
ภาพที่ 41 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติระยะออกรวง (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 ระยะออกรวง (ขวา)

ภาพที่ 42 ลักษณะรวงข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0

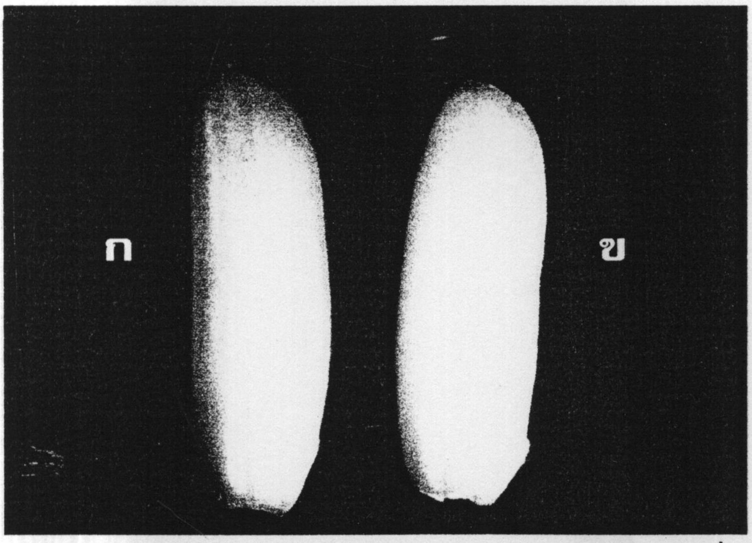


ภาพที่ 43 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 ระยะออกรวง

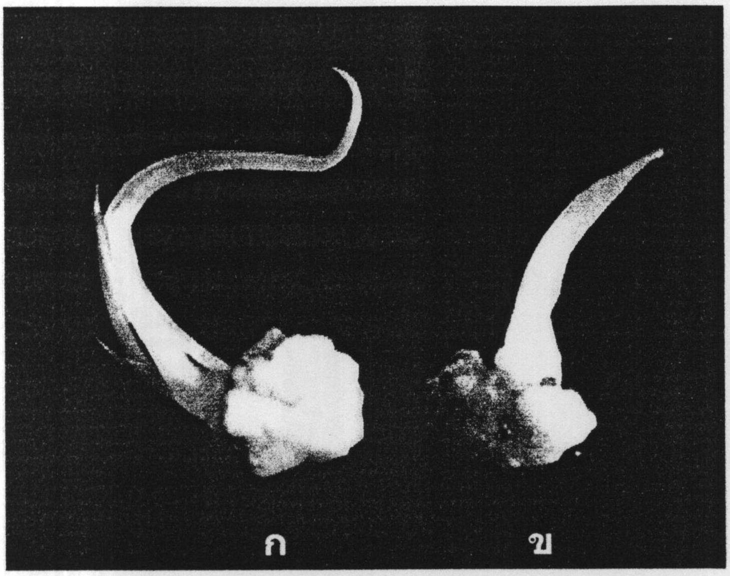
ภาพที่ 44 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติระยะออกรวง(ก) เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 (ข)



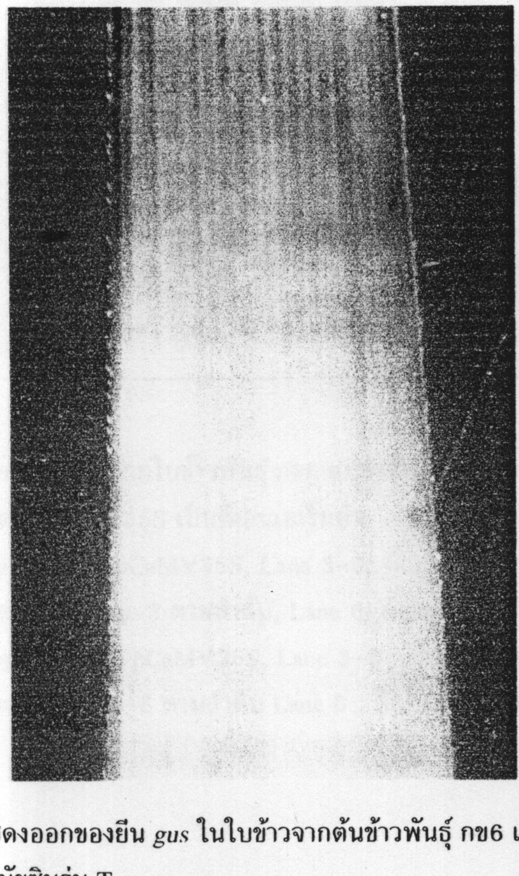
ภาพที่ 45 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0(ก) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ข)



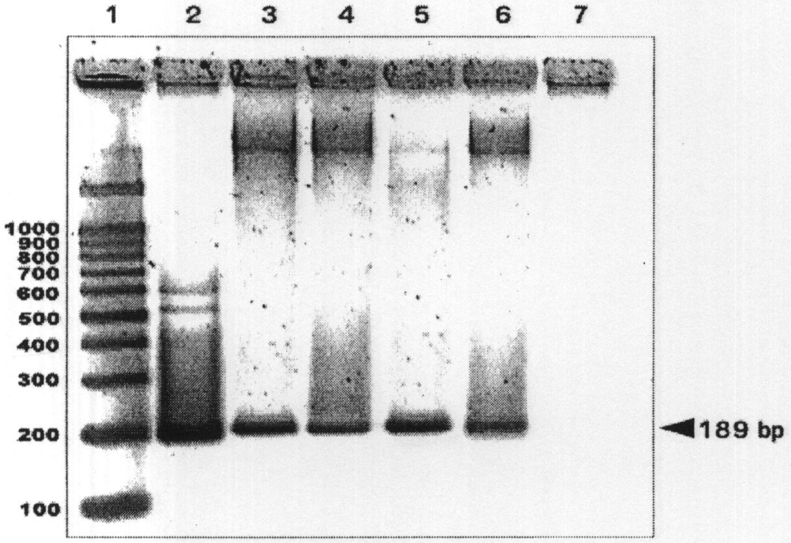
ภาพที่ 46 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1(ก) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ข)

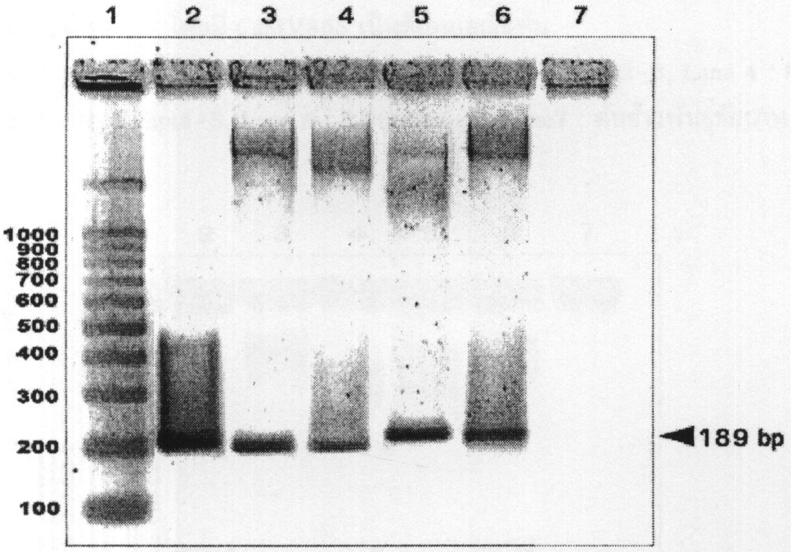


ภาพที่ 47 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสที่ชักนำให้เกิดจากเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ(ก) เปรียบเทียบกับแคลลัสที่ชักนำให้เกิดจากเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 (ข)



ภาพที่ 48 การแสดงออกของยีน *gus* ในใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

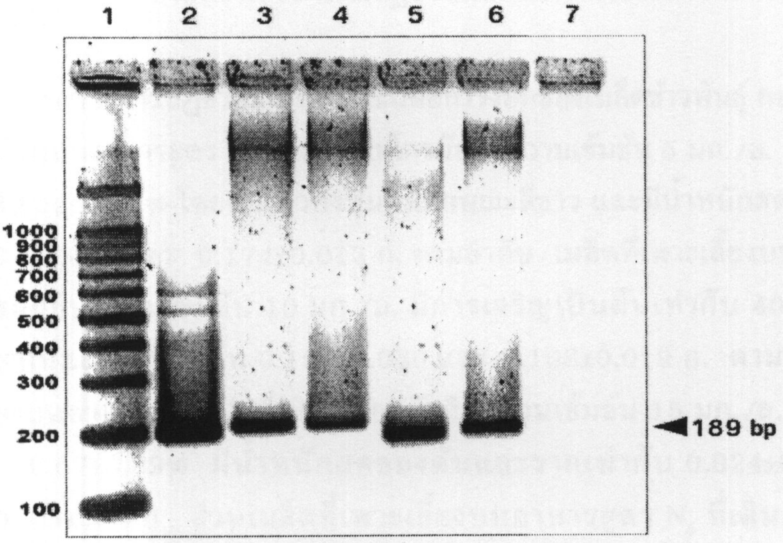




ภาพที่ 49 ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น

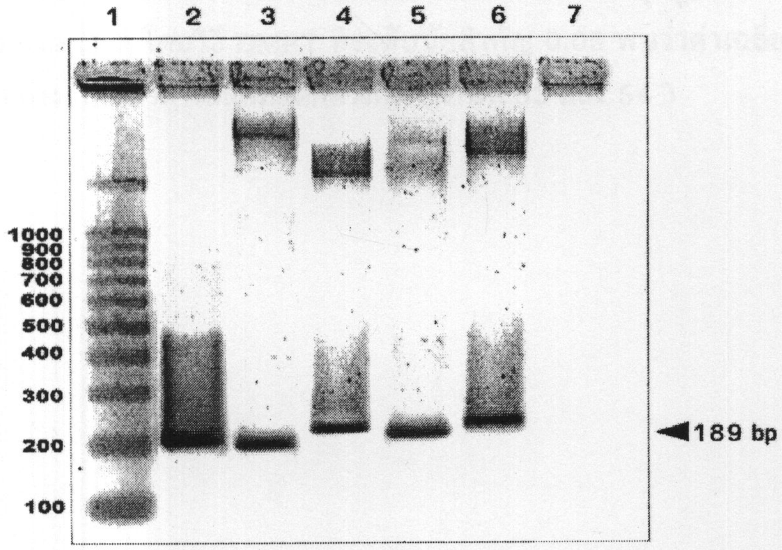
ก. Lane 1: 100 bp, Lane 2: pCaMV35S, Lane 3-5: ดีเอนเอจากใบข้าวรหัส RD6-htp-1, RD6-htp-2 และ RD6-htp-3 ตามลำดับ, Lane 6: ดีเอนเอจากต้นข้าวพันธุ์ กข 6 (ชุดควบคุม)

ข. Lane 1 : 100 bp, Lane 2 : pCaMV35S, Lane 3-5 : ดีเอนเอจากใบข้าวรหัส RD6-htp-4, RD6-htp-5 และ RD6-htp-6 ตามลำดับ Lane 6 : ดีเอนเอจากต้นข้าวพันธุ์ กข 6 (ชุดควบคุม)



ภาพที่ 50 ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น

Lane 1 : 100 bp, Lane 2 : pCaMV35S, Lane 3 : RD6-hpt2-3, Lane 4 : RD6-hpt4-4, Lane 3 : RD6-hpt4-5, Lane 6 : RD6-hpt5-1, Lane7 : ต้นข้าวพันธุ์ชัยนาท 1(ชุดควบคุม)



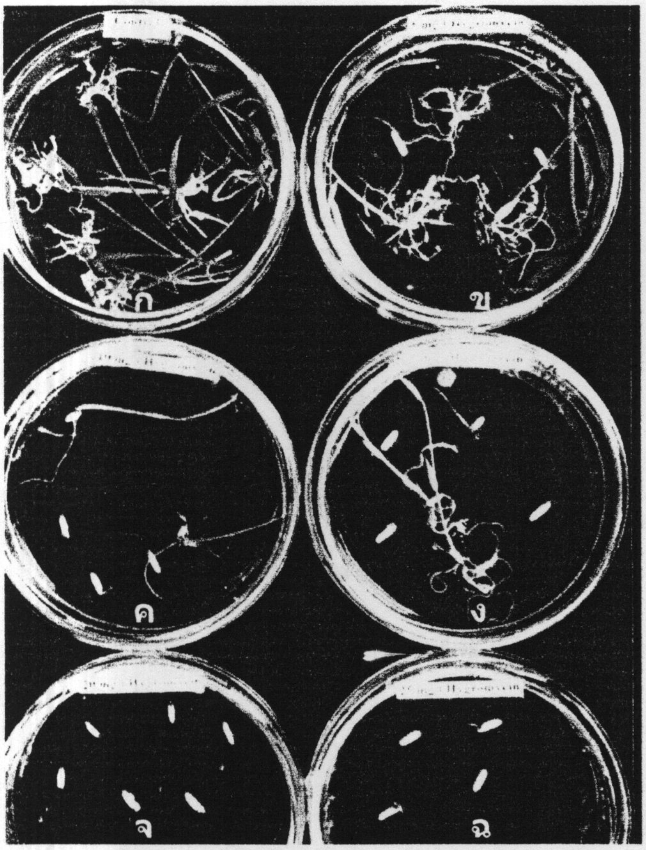
ภาพที่ 51 ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 ด้วยเทคนิค PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอเริ่มต้น

Lane 1 : 100 bp, Lane 2 : pCaMV35S, Lane 3 : RD6-hpt2-3-3, Lane 4 : RD6-hpt3-3-1, Lane 5 : RD6-hpt4-2-5, Lane 6 : RD6-hpt9-7-1, Lane7 : ต้นข้าวพันธุ์ กข6 (ชุดควบคุม)

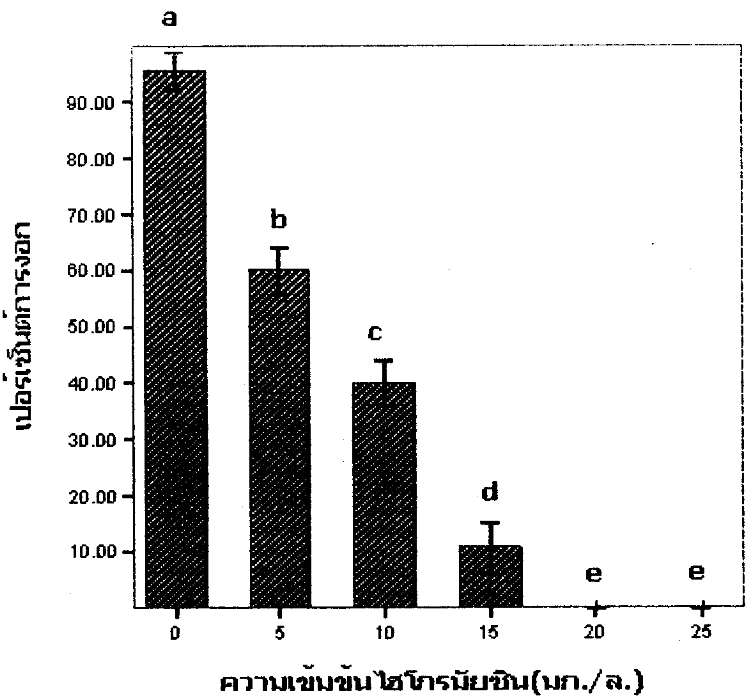
การทดลองที่ 5.2 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 พบว่า เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 และเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มก./ล. มีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 60.02±4.09% โดยต้นข้าวทั้งหมดมีลักษณะสีขาว และมีน้ำหนักสดของต้นและรากเท่ากับ 0.267±0.021 และ 0.174±0.013 ก. ตามลำดับ เมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 10 มก./ล. มีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 40.04±4.06% มีน้ำหนักสดของต้นและรากเท่ากับ 0.164±0.030 และ 0.108±0.019 ก. ตามลำดับ และเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มก./ล. มีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 10.67±4.39% มีน้ำหนักสดของต้นและรากเท่ากับ 0.024±0.014 และ 0.052±0.034 ก. ตามลำดับ ส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 20 และ 25 มก./ล. ไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เติมไฮโกรมัยซินพบว่าเมล็ดข้าวสามารถเจริญเป็นต้นที่มีลักษณะสีเขียวภายในเวลา 3-4 วัน และมีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 96.66±3.23% มีน้ำหนักสดของต้นและรากเท่ากับ 0.272±0.014 และ 0.157±0.013 ก. ตามลำดับ ดังแสดงผลในภาพที่ 52, 53 และ 54

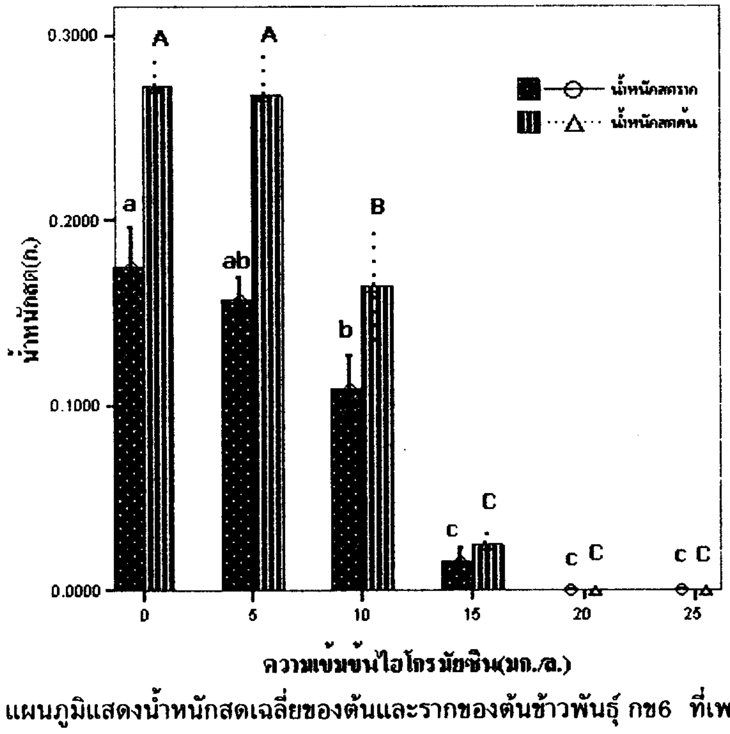
จากการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินทุกคู่ต่อการงอกของเมล็ดและน้ำหนักสดต้นและราก โดยวิธี DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกัน มีค่าทางสถิติที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 53 และ 54)



ภาพที่ 52 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ (ก. 0 มก./ล., ข. 5 มก./ล., ค. 10 มก./ล., ง. 15 มก./ล., จ. 20 มก./ล., ฉ. 25 มก./ล.)



ภาพที่ 53 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์กข 6 บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ



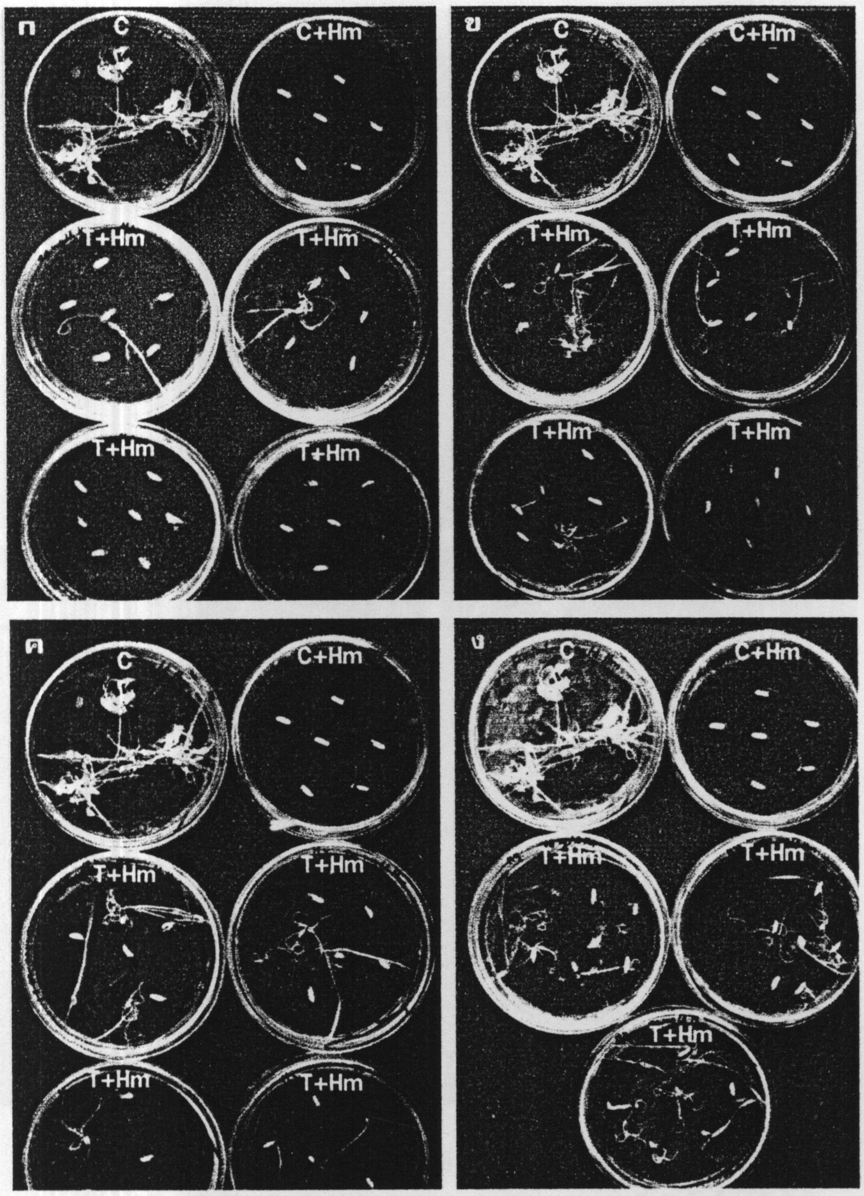
ภาพที่ 54 แผนภูมิแสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นและรากของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ

<u>ผลการทดลองที่ 5.3</u> การศึกษาอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_0 และ T_1

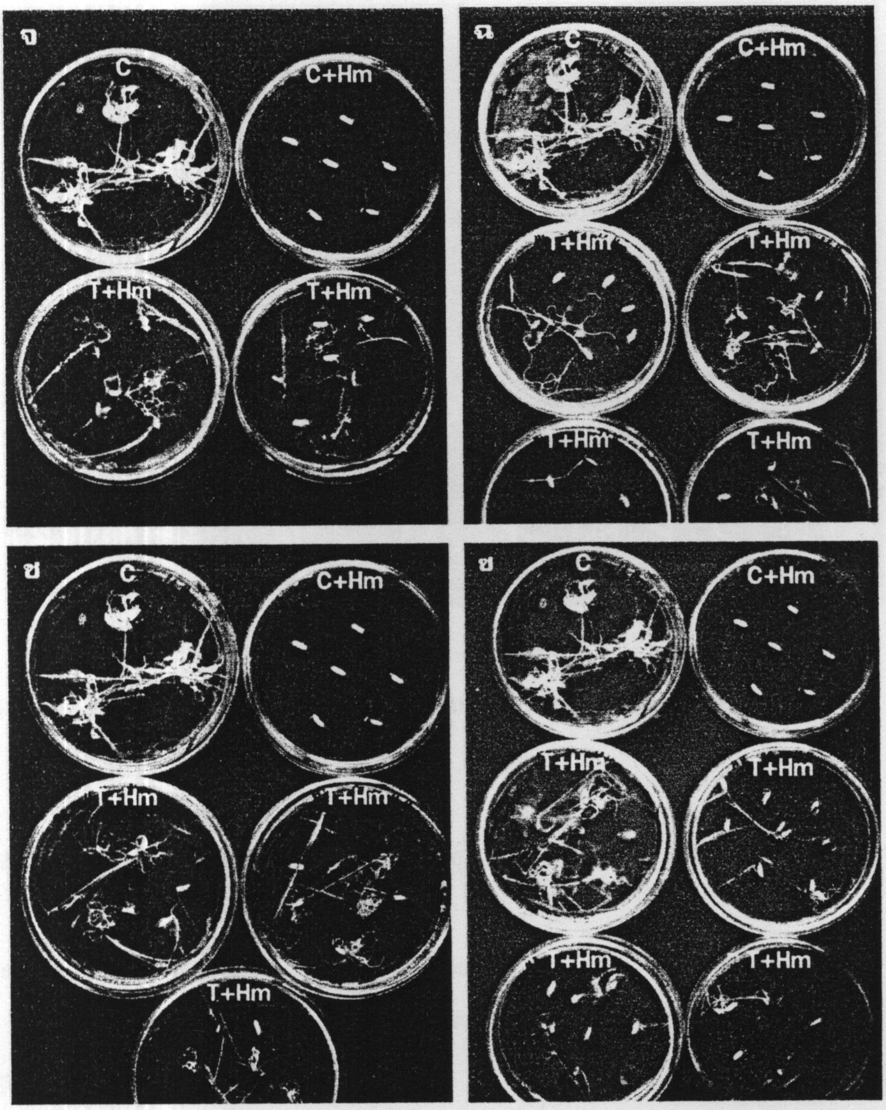
การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. เป็นเวลา 3-4 วัน มียอดอ่อนสีเขียวเจริญจากบริเวณคัพภะ และยอดอ่อนเจริญเป็นต้นที่มีลักษณะสีเขียวในเวลาต่อมา แต่ยอดอ่อนของเมล็ดบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ ส่วนเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ ดังแสดงผลในภาพที่ 55 และ 56

การศึกษาอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_0 พบว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ รหัส RD6-htp2, RD6-htp4, RD6-htp5 และ RD6-htp7 มีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินเท่ากับ 3:1 ($p<0.05$) ส่วนเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ รหัส RD6-htp3, RD6-htp6, RD6-htp8 และ RD6-htp9 มีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินเท่ากับ 1:1 ($p<0.05$) ดังแสดงผลในตารางที่ 4

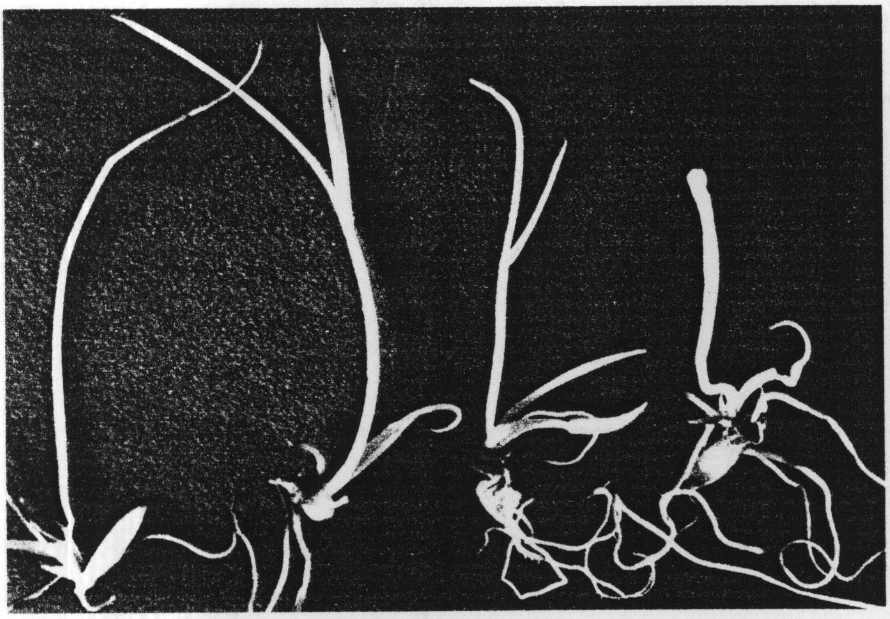
การศึกษาอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 พบว่า เมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์รหัส RD6-htp2-3, RD6-htp4-4, RD6-htp4-5 และ RD6-htp5-1 มีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1 ($p<0.05$) ดังแสดงผลในตารางที่ 5



ภาพที่ 55 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. ก. RD6-hpt1, ข. RD6-hpt2, ค. RD6-hpt3, ง. RD6-hpt4 (C=เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติบนอาหารไม่เติมไฮโกรมัยซิน, C+Hm=เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล., T+Hm= เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6แปลงพันธุ์บนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล.)



ภาพที่ 56 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ บนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 20 มก./ล. ก. RD6-hpt5, ข. RD6-hpt6, ค. RD6-hpt7 , ง. RD6-hpt8 (C=เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติบนอาหารไม่เติมไฮโกรมัยซิน, C+Hm=เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ บนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล., T+Hm= เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6แปลงพันธุ์บนอาหารเติม ไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล.)



ภาพที่ 57 ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 อายุ 7 วัน

ตารางที่ 4 Segregation pattern ในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_0

T_0 parent	จำนวนเมล็ดที่ทดสอบ	Ratio resistance/sensitive	χ^2	ρ
RD6-htp 2	40	3:1	0.167	0.683
RD6-htp 3	40	1:1	1.084	0.297
RD6-htp 4	40	3:1	0.025	0.755
RD6-htp 5	40	3:1	0.026	0.873
RD6-htp 6	40	1:1	0.043	0.835
RD6-htp 7	40	3:1	0.710	0.399
RD6-htp 8	45	1:1	0.04	0.841
RD6-htp 9	50	1:1	0.00	1.0

ตารางที่ 5 Segregation pattern ของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_1

T_1 parent	จำนวนเมล็ดที่ทดสอบ	Ratio of resistance/sensitive	χ^2	ρ
RD6-htp 2-3	45	3:1	2.57	0.108
RD6-htp 4-4	39	3:1	0.667	0.414
RD6-htp 4-5	45	3:1	0.014	0.904
RD6-htp 5-1	45	3:1	3.57	0.059

ผลการทดลองที่ 5.4 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติและข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน

5.5.1 การวัดค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบ

การวัดค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_2 พบว่าค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน อายุ 1 เดือน รหัส RD6-hpt3-3-1, RD6-hpt4-2-5, RD6-hpt5-1-4, RD6-hpt9-7-1 และ RD6-hpt2-3-3 มีค่าเท่ากับ -1.172±0.482, -1.183±0.320, -1.182±0.851, -1.176±0.119 และ -1.168±0.122 ตามลำดับ และค่าศักย์ออสโมซิสมีค่าลดลงในใบข้าวอายุ 2 เดือนโดยมีค่าเท่ากับ -1.263±0.159,-1.292±0.101, -1.271±0.087, -1.298±0.129, -1.268±0.187 ตามลำดับ และค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติอายุ 1 เดือนและ 2 เดือน มีค่าเท่ากับ -1.18±0.055 และ 1.268±0.938 ตามลำดับ (ภาพที่ 58)

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวควบคุมและค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 อายุ 1 เดือน ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 สำหรับค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวควบคุมและค่าศักย์ออสโมซิสของน้ำคั้นจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 อายุ 2 เดือนไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เช่นเดียวกัน

5.5.2 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

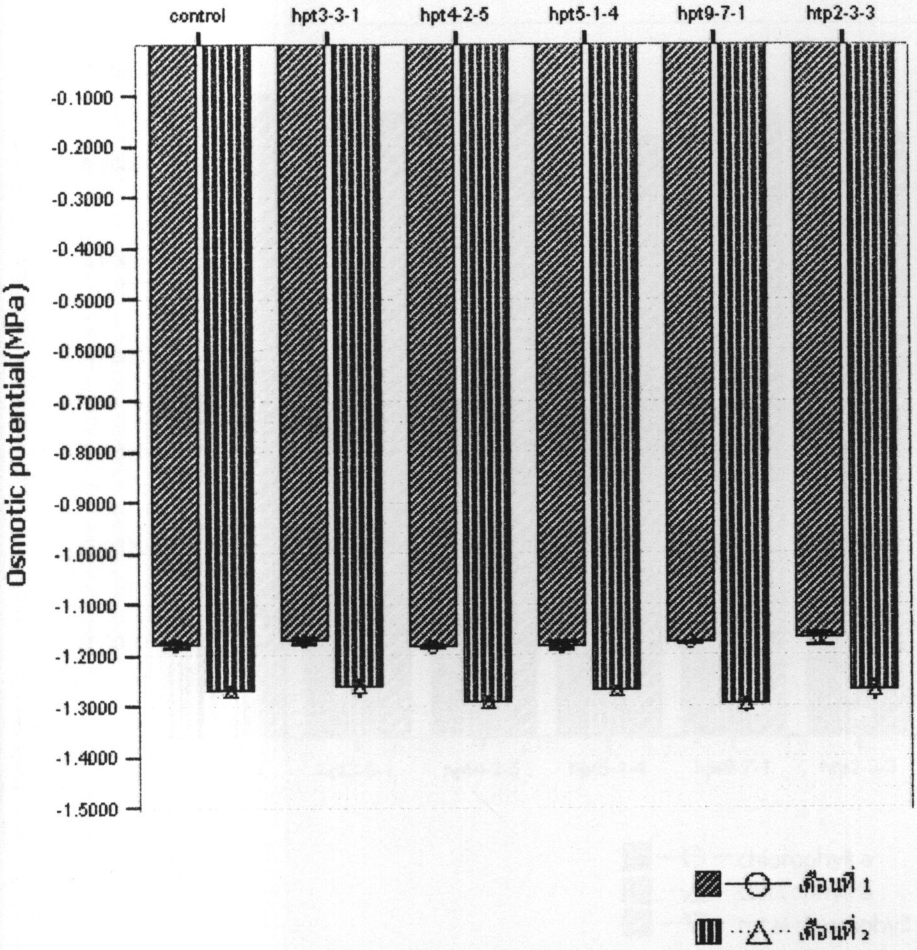
การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากใบข้าวอายุ 3 เดือนของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรหัส RD6-hpt3-3-1, RD6-hpt4-2-5, RD6-hpt5-1-4, RD6-hpt9-7-1 และ RD6-hpt2-3-3 มีค่าเท่ากับ 3.46±0.39, 3.55±0.19, 3.33±0.26, 3.42± 0.27 และ 3.26±0.11 ตามลำดับ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจากใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติมีค่าเท่ากับ 3.67±0.19

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์บีจากใบข้าวอายุ 3 เดือนของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์บีจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรหัส RD6-hpt3-3-1, RD6-hpt4-2-5, RD6-hpt5-1-4, RD6-hpt9-7-1 และ RD6-hpt2-3-3 มีค่าเท่ากับ 3.07±0.14, 3.16±0.05, 3.03±0.19, 3.10±0.08 และ 3.06±0.13 ตามลำดับ ปริมาณคลอโรฟิลล์บีจากใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ มีค่าเท่ากับ 3.07±0.08

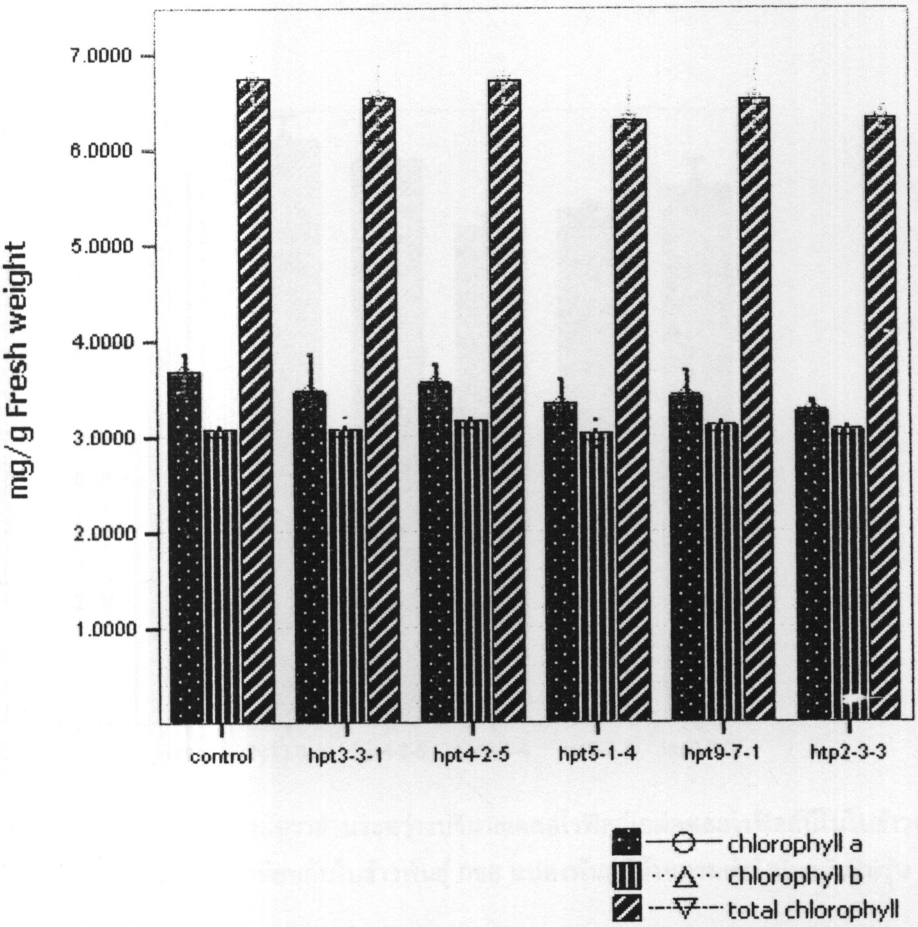
การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากใบข้าวอายุ 3 เดือนของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรหัส RD6-hpt3-3-1, RD6-hpt4-2-5, RD6-hpt5-1-4, RD6-hpt9-7-1 และ RD6-hpt2-3-3 มีค่าเท่ากับ 6.54±0.54, 6.71±0.25, 6.29±0.43, 6.52±0.36 และ 6.32±0.13 ตามลำดับ ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ มีค่าเท่ากับ 6.74±0.25 (ภาพที่ 59)

อัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บีในใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรหัส RD6-hpt3-3-1, RD6-hpt4-2-5, RD6-hpt5-1-4, RD6-hpt9-7-1 และ RD6-hpt2-3-3 มีค่าเท่ากับ 1.18±0.51, 1.12±0.37, 1.00±0.39, 1.04±0.17 และ 1.08±0.52 ตามลำดับ ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมจากใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ มีค่าเท่ากับ 1.09±0.24 (ภาพที่ 60)

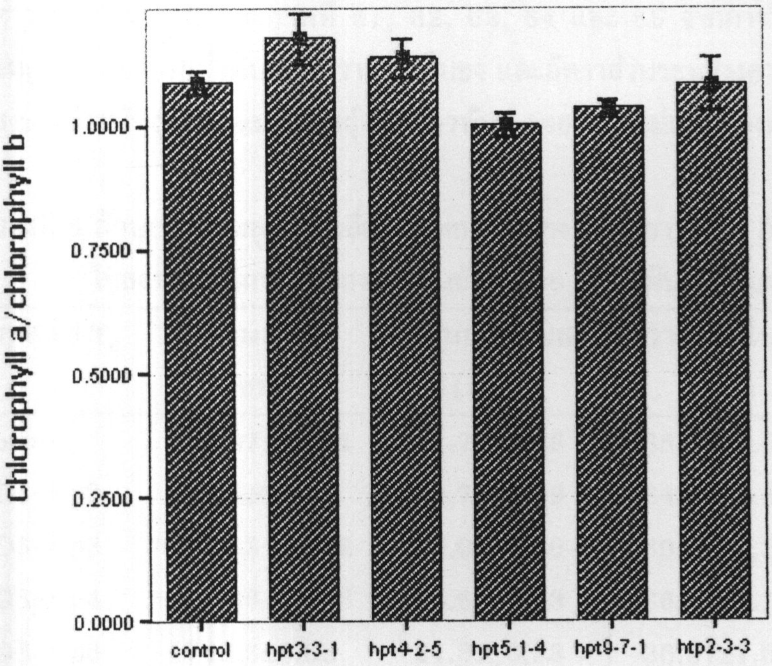
จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บีในใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติและใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 58 แผนภูมิแสดงค่าศักย์ออสโมติสของน้ำคั้นจากใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 อายุ 1 เดือน และ 2 เดือน



ภาพที่ 59 แผนภูมิแสดงปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมของใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2



ภาพที่ 60 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บีในใบข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับใบข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2

ผลการทดลองที่ 5.5 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ และข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน

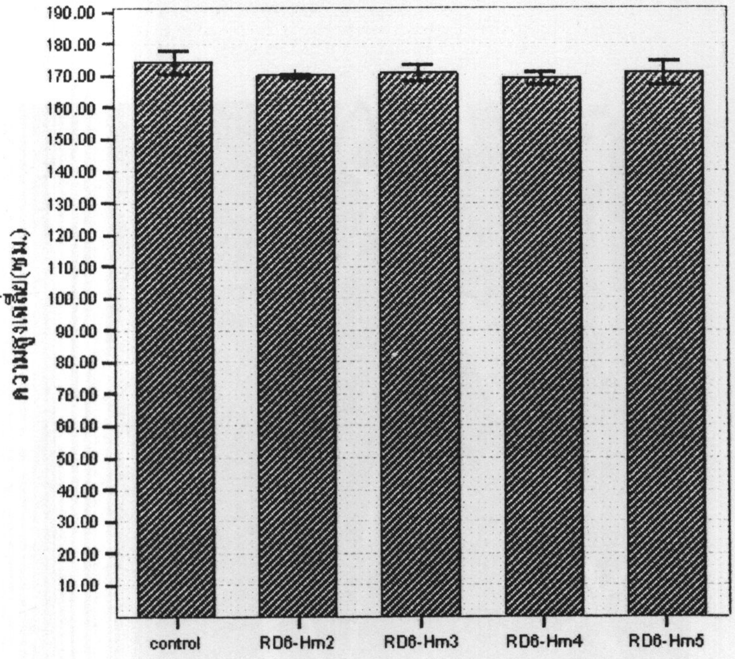
การศึกษาความสูงต้น และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบธงข้าวพันธุ์ กข6 ปกติและใบธงข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และ T_1 พบมีลักษณะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 และภาพที่ 61, 62, 63, 64 และ 65 จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ความสูงต้น ความกว้างใบธง ความยาวใบธง และอัตราส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ และข้าวพันธุ์ กข6 ปกติไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 6 ลักษณะความสูงต้นเฉลี่ย ความกว้างใบธง ความยาวใบธง อัตราส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของต้นข้าว กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0

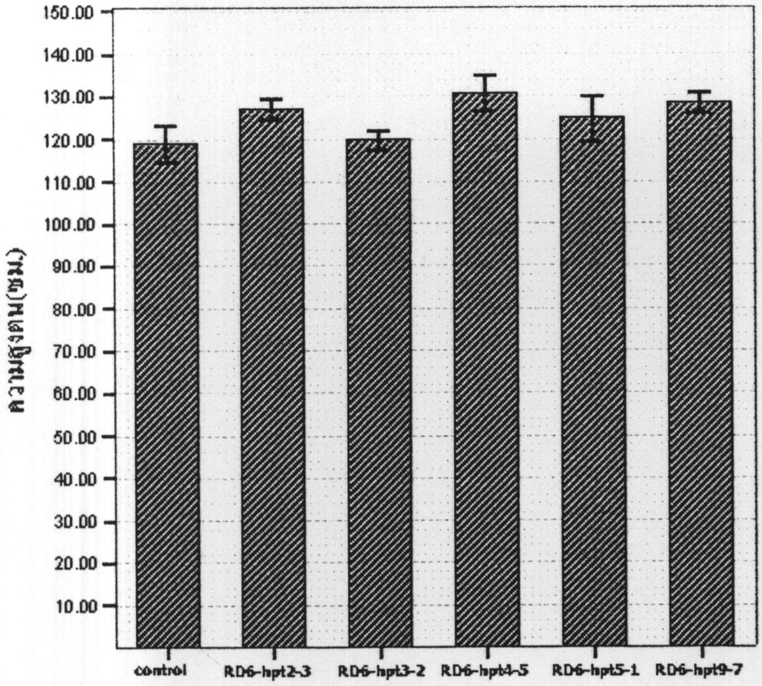
รหัสพืช T_0	ความสูงต้น (ซม.)	ความกว้างใบธง (มม.)	ความยาวใบธง (ซม.)	ความยาวใบธง/ความกว้างใบธง
Control	169.97±3.661	21.76±1.36	35.06±1.56	16.85±0.14
RD6-htp2	170.5±0.768	22.76±1.49	34.80±1.54	15.44±4.08
RD6-htp3	169.13±2.532	22.03±1.00	30.53±2.33	15.77±3.48
RD6-htp4	170.86±2.168	23.67±0.93	36.40±1.16	12.92±5.66
RD6-htp5	174.36±3.66	21.33±0.58	36.37±1.59	17.10±0.11

ตารางที่ 7 ลักษณะความสูงต้นเฉลี่ย ความกว้างใบธง ความยาวใบธง อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างใบธงของต้นข้าว กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

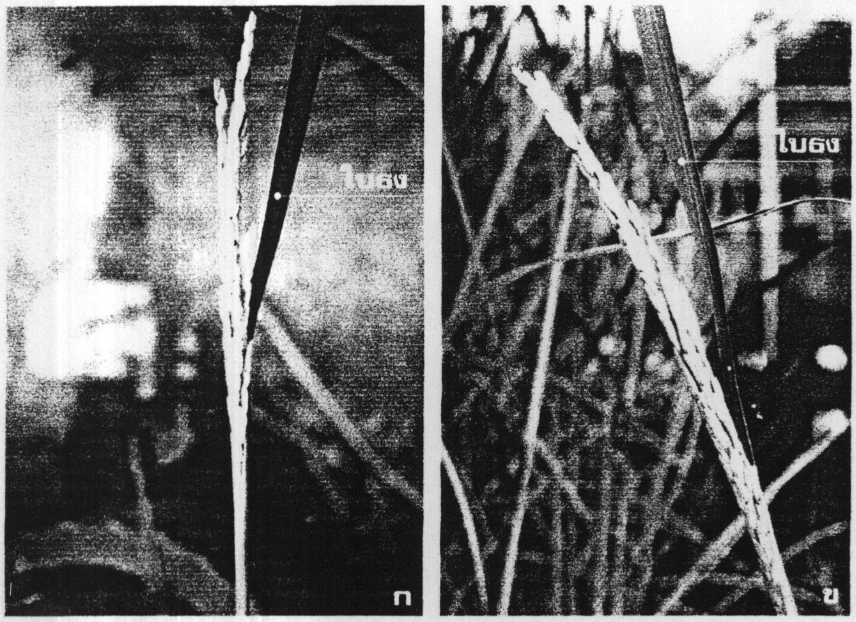
รหัสพืช T_1	ความสูงต้น (ซม.)	ความกว้างใบธง (มม.)	ความยาวใบธง (ซม.)	ความยาวใบธง/ความกว้างใบธง
Control	119.00±2.51	23.40±1.21	33.56±3.21	14.34±1.12
RD6-htp2-3	127.00±2.33	22.63±1.48	33.33±2.99	14.95±2.13
RD6-htp3-2	119.67±4.37	22.40±0.61	33.73±1.65	15.10±1.51
RD6-htp4-5	130.67±5.36	21.33±0.64	35.03±1.78	16.42±1.64
RD6-htp5-1	124.67±2.60	22.67±0.99	35.86±2.21	15.87±1.12
RD6-htp9-7	128.33±4.35	24.96±0.85	36.56±0.56	14.66±1.46



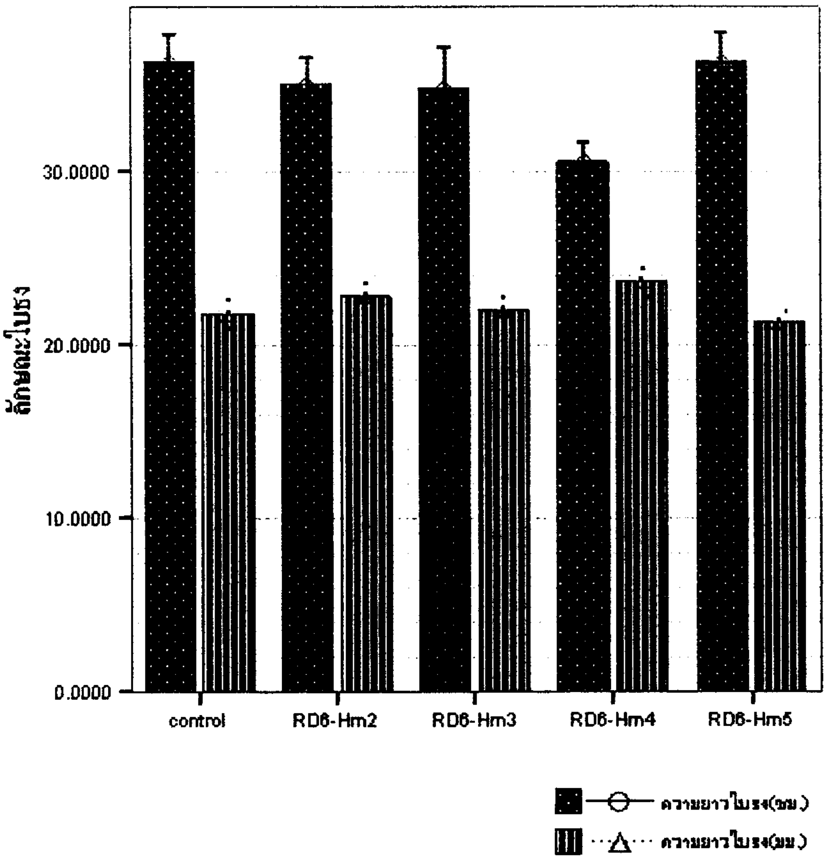
ภาพที่ 61 แผนภูมิแสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



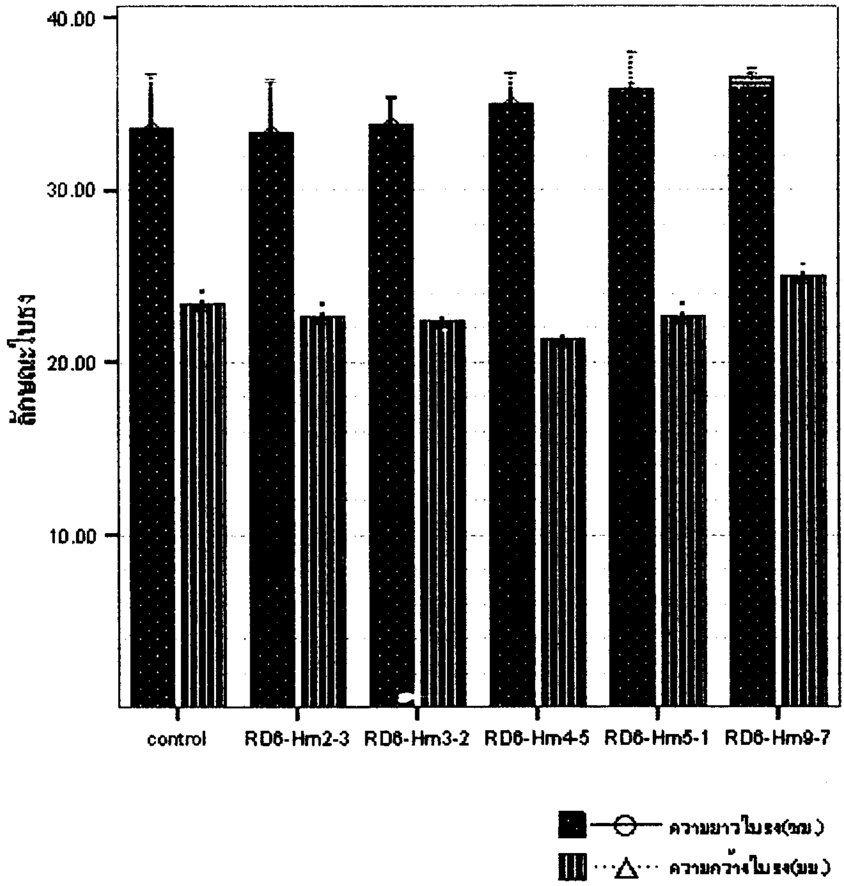
ภาพที่ 62 แผนภูมิแสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1



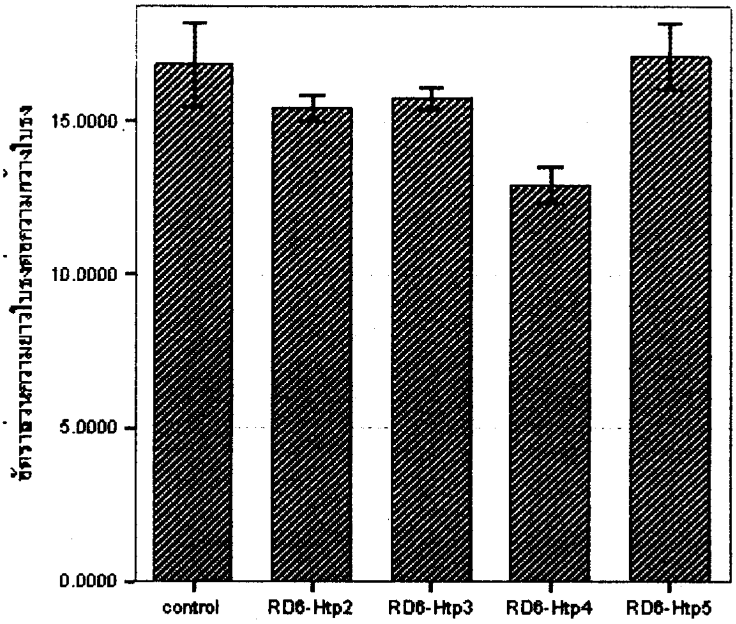
ภาพที่ 63 ลักษณะใบธงของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ(ก) เปรียบเทียบกับใบธงของต้นข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ รุ่น T_1(ข)



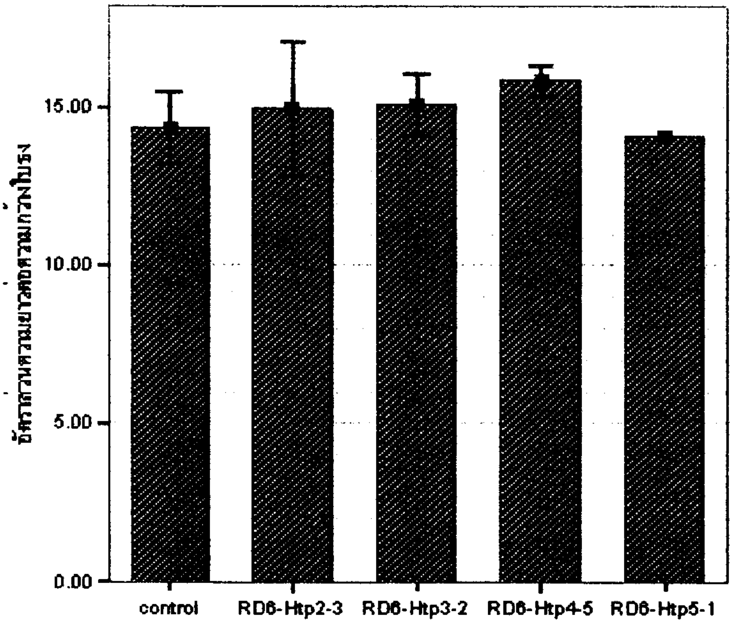
ภาพที่ 64 แผนภูมิแสดงความกว้างใบธง และความยาวใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



ภาพที่ 65 แผนภูมิแสดงความกว้างใบธง และความยาวใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1



ภาพที่ 66 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



ภาพที่ 67 แผนภูมิแสดงอัตราส่วนระหว่างความยาวใบธงต่อความกว้างใบธงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

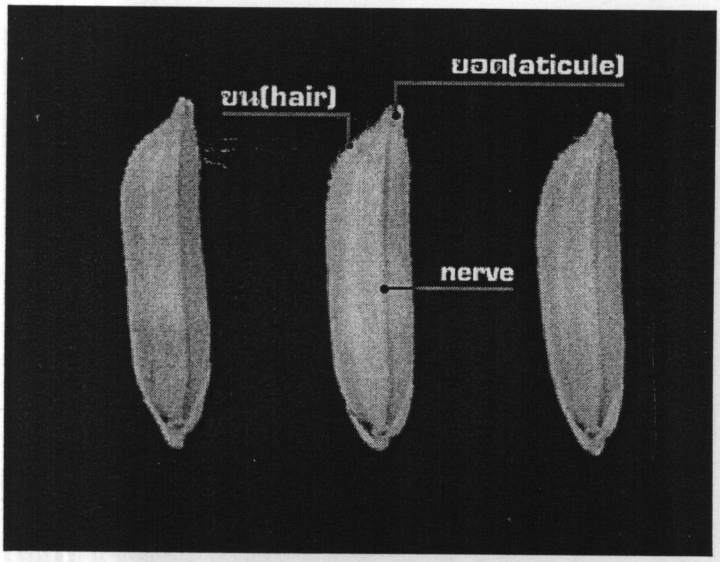
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกร-มัยซินรุ่น T_0 และ T_1 เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ พบว่าเมล็ดข้าวทั้งสองชนิดมีสีเหลืองทอง และมีขน(hair)ทั่วทั้งเปลือก และสังเกตพบส่วนยอด(apicule) และ nerve เมื่อแกะเมล็ดข้าวออกพบเมล็ดข้าวกล้องที่มีคัพภะและเอนโดสเปิร์มเป็นองค์ประกอบ โดยคัพภะและเอนโดสเปิร์มมีสีขาวขุ่น และมี nerve ชัดเจน (ภาพที่ 68, 69, 70 และ 71) และแสดงผลความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างเมล็ดในตารางที่ 8 และ 9 และภาพที่ 72 และ 73 จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ และข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 8 ลักษณะความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0

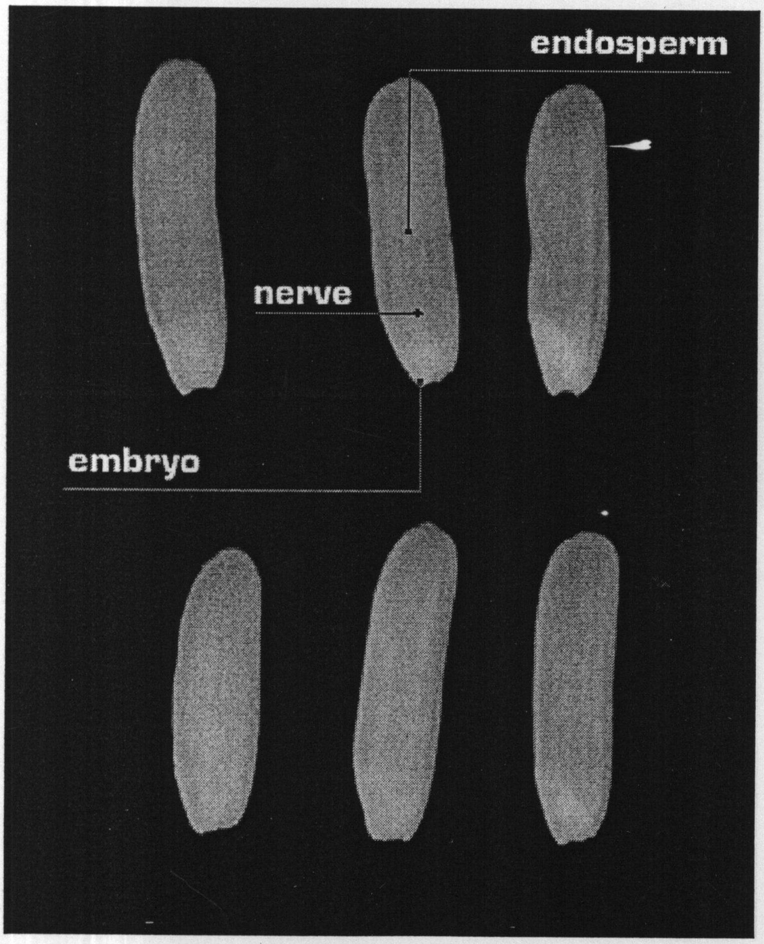
รหัสพืช T_0	ความกว้างเมล็ด (มม.)	ความยาวเมล็ด (มม.)	ความยาวเมล็ด/ความกว้างเมล็ด
Control	2.276±0.202	7.230±0.115	3.176±0.341
RD6-htp2	2.284±0.881	7.233±0.166	3.168±0.192
RD6-htp3	2.293±0.120	7.256±0.348	3.164±0.301
RD6-htp4	2.283±0.153	7.196±0.167	3.156±0.174
RD6-htp5	2.283±0.120	7.240±0.577	3.170±0.143
RD6-htp7	2.303±0.186	7.233±0.120	3.140±0.303

ตารางที่ 9 ลักษณะความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ดและอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

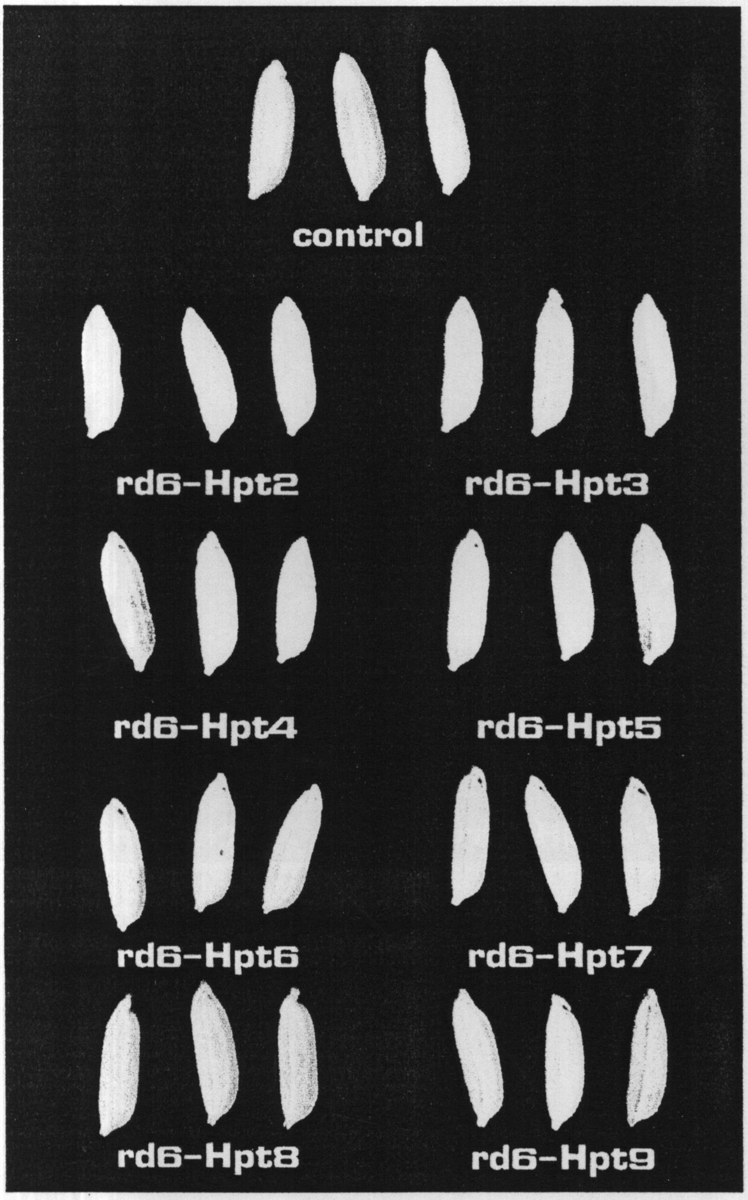
รหัสพืช T_1	ความกว้างเมล็ด (มม.)	ความยาวเมล็ด (มม.)	ความยาวเมล็ด/ความกว้างเมล็ด
Control	2.213±0.441	7.243±0.233	3.207±0.165
RD6-htp2-3	2.210±0.458	7.230±0.435	3.020±0.129
RD6-htp3-2	2.223±0.371	7.236±0.348	3.229±0.598
RD6-htp4-5	2.230±0.178	7.240±0.881	3.221±0.440
RD6-htp5-1	2.270±0.252	7.266±0.360	3.217±0.317
RD6-htp9-7	2.270±0.264	7.210±0.116	3.192±0.144



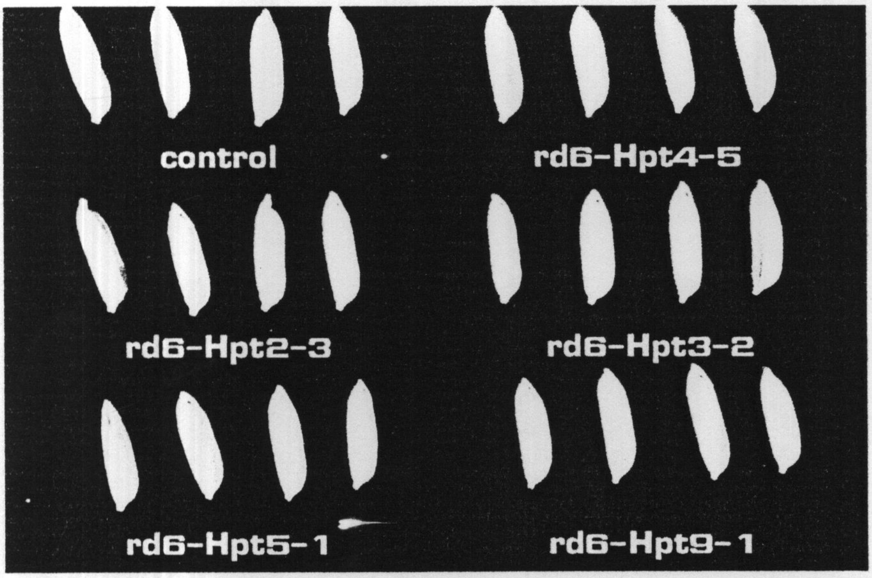
ภาพที่ 68 ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน (กลางและขวา)



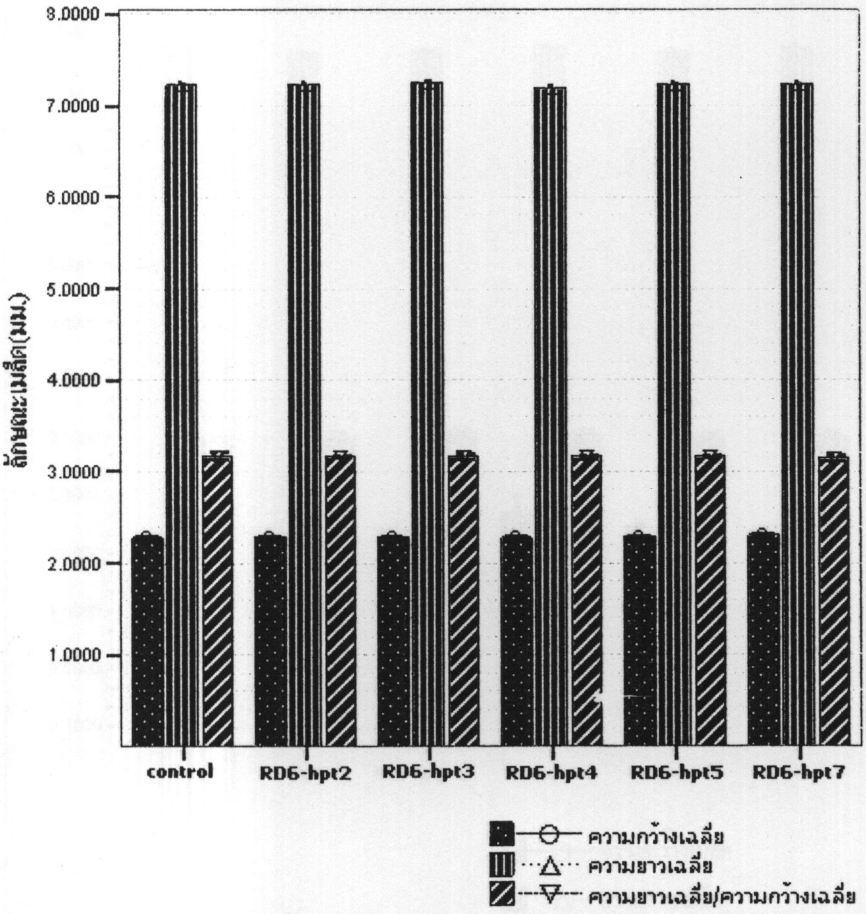
ภาพที่ 69 ลักษณะเมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ (แถวบน) เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน (แถวล่าง)



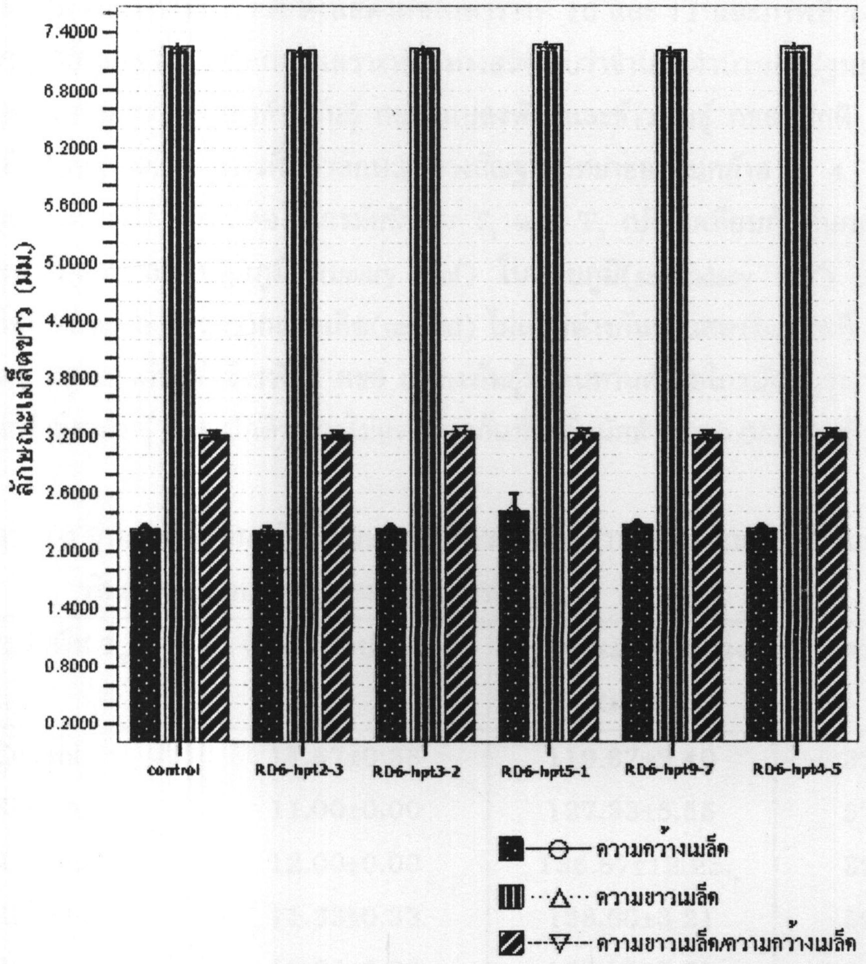
ภาพที่ 70 ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



ภาพที่ 71 ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1



ภาพที่ 72 แผนภูมิแสดงความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



ภาพที่ 73 แผนภูมิแสดงความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และอัตราส่วนระหว่างความยาวเมล็ดต่อความกว้างของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

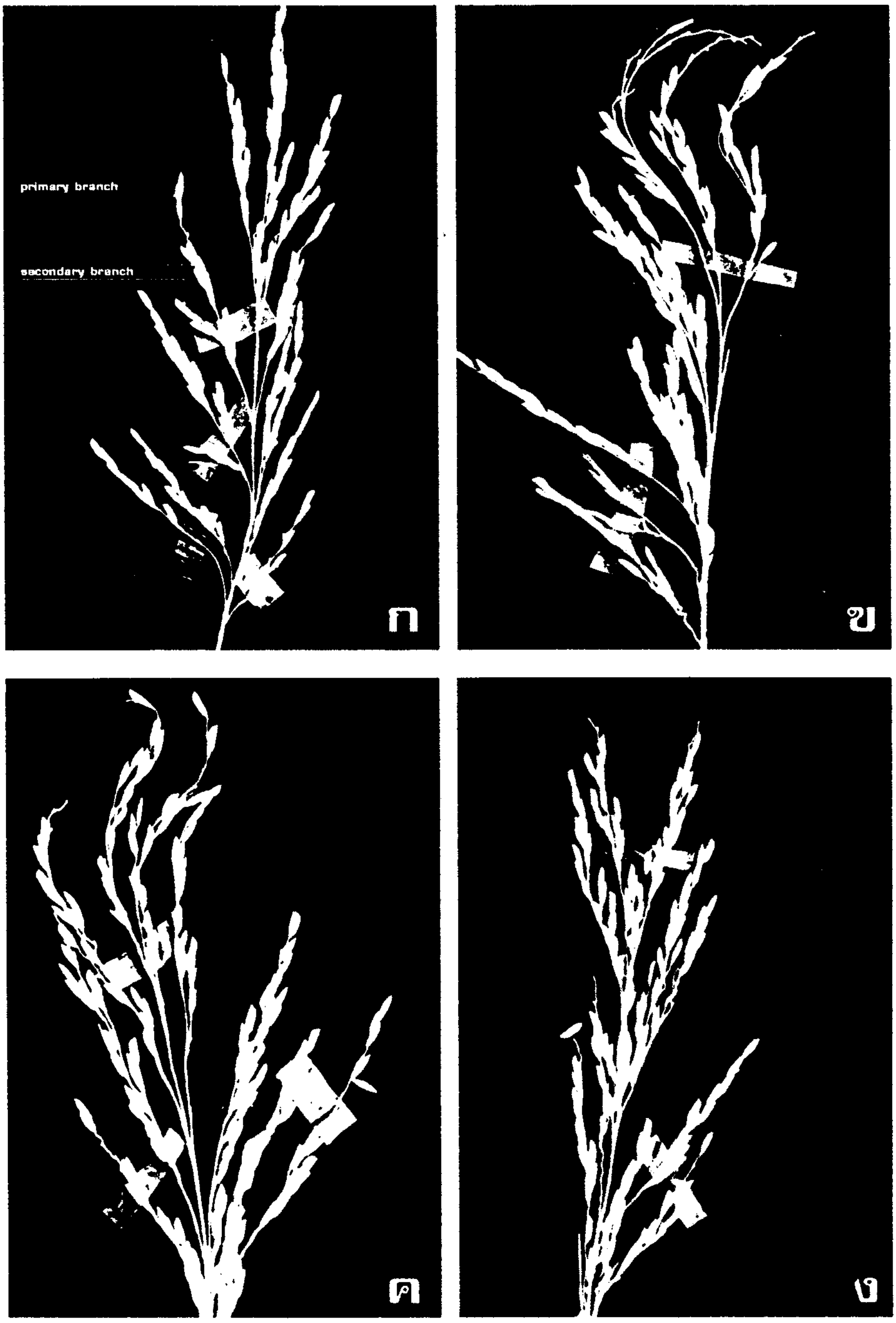
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรวงข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกร-มัยซินรุ่น T_0 และ T_1 เปรียบเทียบกับรวงข้าวพันธุ์ กข6 ปกติพบว่ามีจำนวนกิ่งปฐมภูมิ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความยาวรวง ดังแสดงผลในตารางที่ 10 และ 11 และภาพที่ 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 และ 81 จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าจำนวนจำนวนกิ่งปฐมภูมิ จำนวนเมล็ดต่อรวงและความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์และข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าอายุ 4 วันของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 และ T_2 เปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 ปกติพบว่ามีลักษณะใบปฐมภูมิ(primary leaf) ใบทุติยภูมิ(secondary leaf) เนื้อเยื่อหุ้มยอด-แรกเกิด(coleoptile) และรากแรกเกิด(radical) ไม่แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 82 การ-เปรียบเทียบความสูงของต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 อายุ 10 วันกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 ปกติพบว่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05(ภาพที่ 83 และ 84)

ตารางที่ 10 จำนวนกิ่งปฐมภูมิ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลง-พันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0

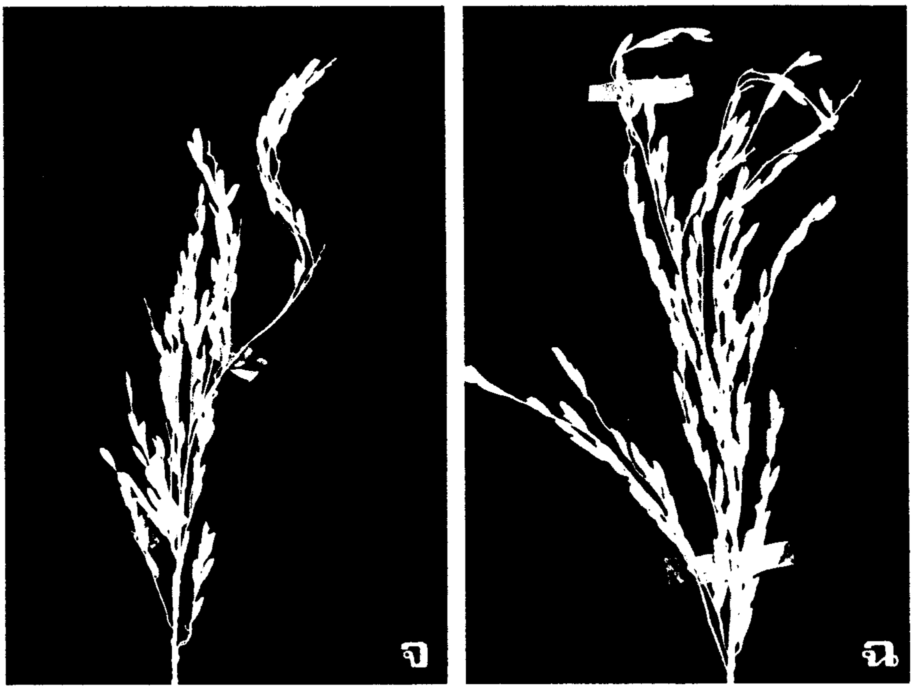
รหัสพืช T_0	จำนวนกิ่งปฐมภูมิ	จำนวนเมล็ดต่อรวง (เมล็ด)	ความยาวรวง (ซม.)
Control	11.67±0.33	119.67±2.40	32.10±0.98
RD6-htp2	11.00±0.00	127.33±5.55	37.26±1.49
RD6-htp3	12.00±0.00	136.67±12.25	32.63±2.18
RD6-htp4	11.33±0.33	128.00±3.21	36.73±2.32
RD6-htp5	11.00±0.00	130.00±5.29	34.70±0.91
RD6-htp7	11.67±0.33	129.67±5.24	33.50±1.12

ตารางที่ 11 จำนวนกิ่งปฐมภูมิ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลง-พันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

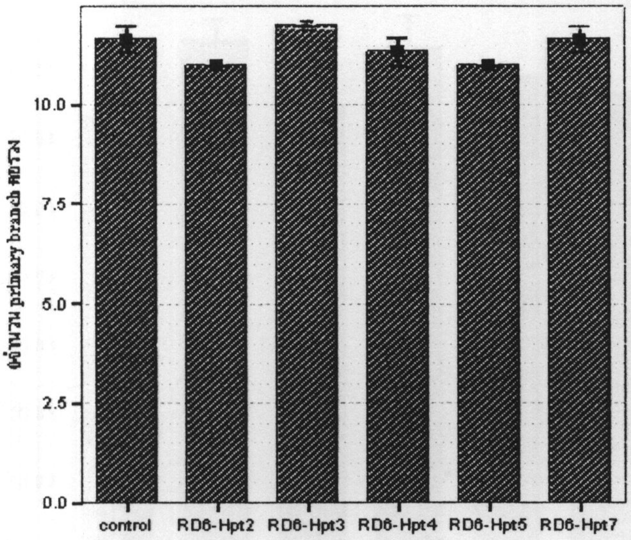
รหัสพืช T_1	จำนวนกิ่งปฐมภูมิ	จำนวนเมล็ดต่อรวง (เมล็ด)	ความยาวรวง (ซม.)
Control	11.33±0.33	128.67±23.31	30.67±1.58
RD6-htp2-3	11.67±0.33	119.68±4.33	31.42±1.43
RD6-htp3-2	11.00±0.00	124.33±4.1	29.03±0.77
RD6-htp4-5	11.33±0.33	123.00±3.21	29.91±1.82
RD6-htp5-1	11.00±0.58	115.00±4.16	27.43±0.92
RD6-htp9-7	11.67±0.33	134.33±11.98	29.70±1.19



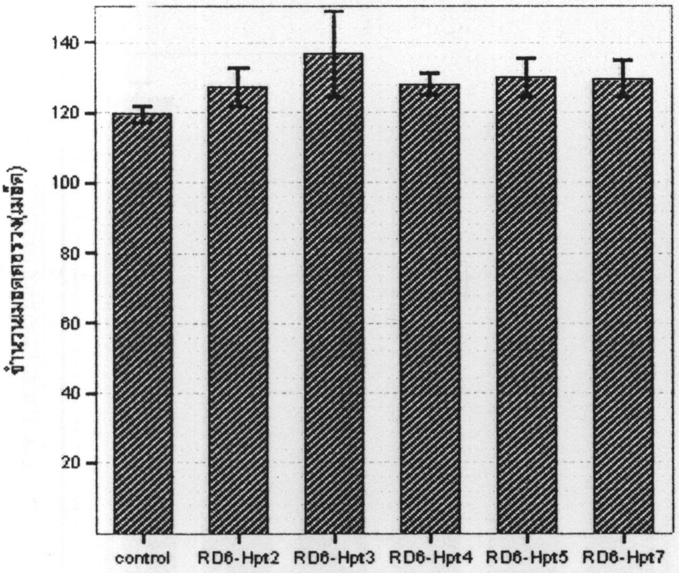
ภาพที่ 74 ลักษณะรวงข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ(ก) เปรียบเทียบกับรวงข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_1 (ข. RD6-Hpt2-3, ค. RD6-Hpt3-2 และ ง. RD6-Hpt4-5)



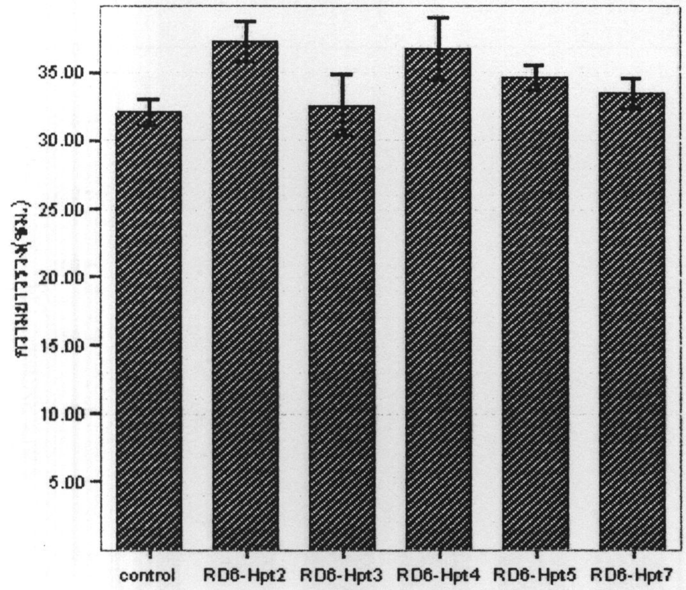
ภาพที่ 75 ลักษณะรวงข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_1(จ. RD6-Hpt5-1, ฉ. RD6-Hpt9-7)



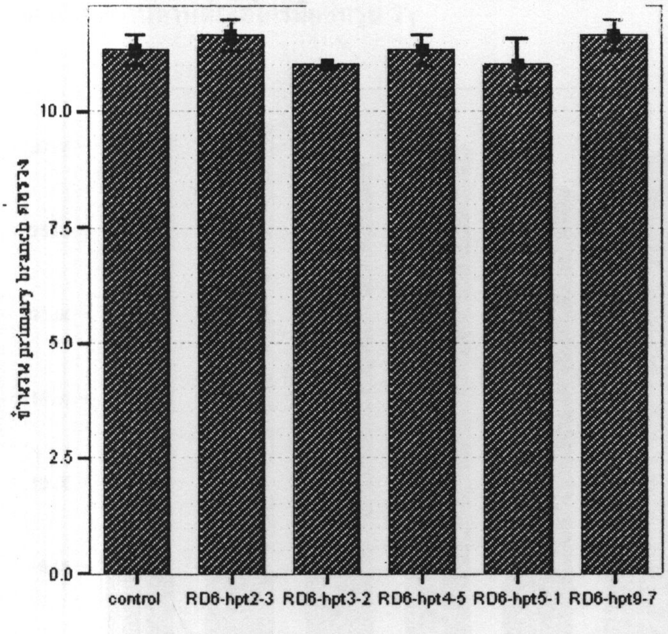
ภาพที่ 76 แผนภูมิแสดงจำนวนกิ่งปฐมภูมิต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



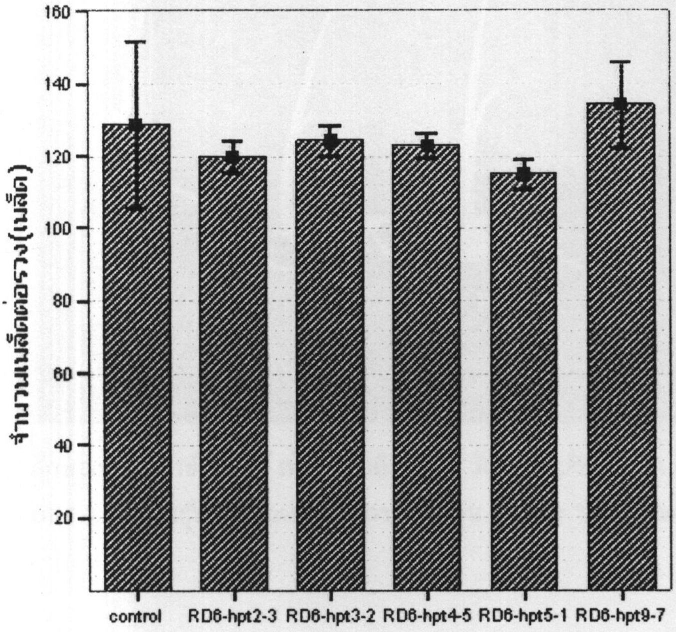
ภาพที่ 77 แผนภูมิแสดงจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



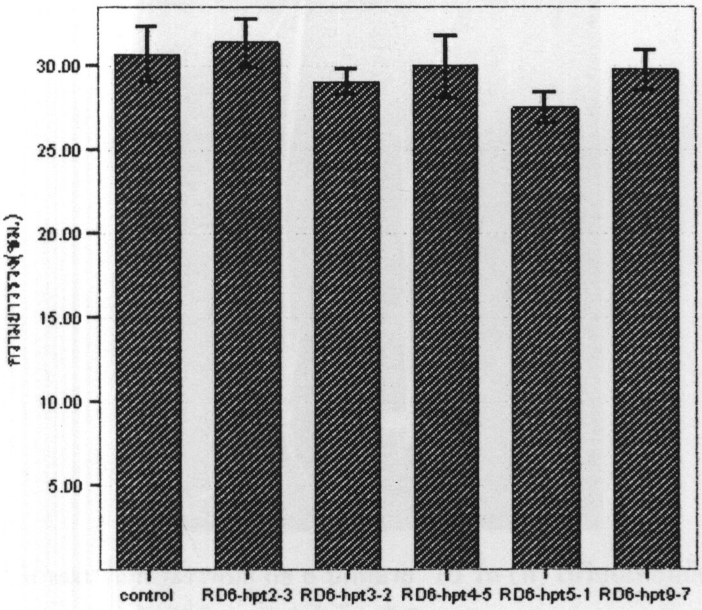
ภาพที่ 78 แผนภูมิแสดงความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0



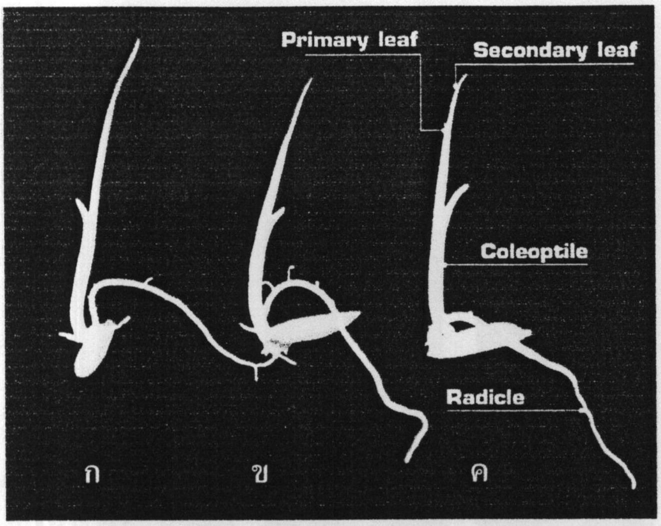
ภาพที่ 79 แผนภูมิแสดงจำนวนกิ่งปฐมภูมิต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1



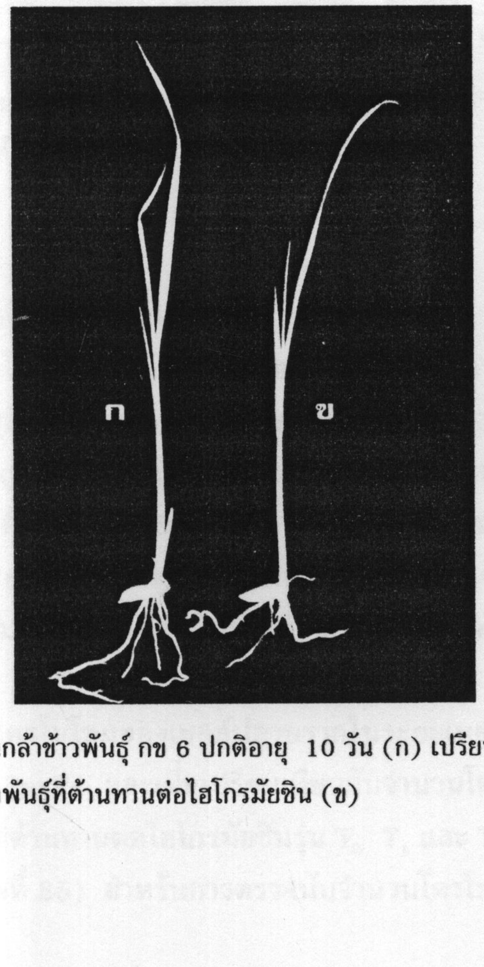
ภาพที่ 80 แผนภูมิแสดงจำนวนเมล็ดต่อรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1



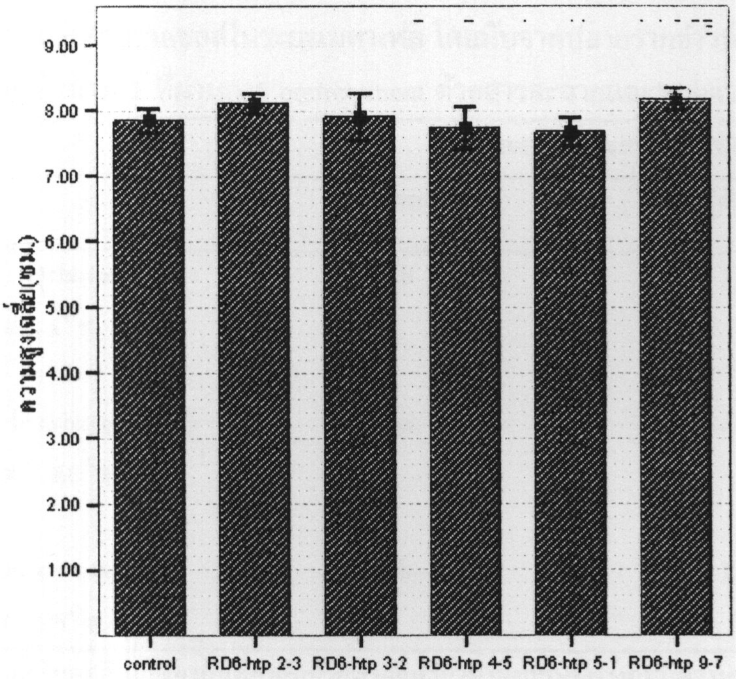
ภาพที่ 81 แผนภูมิแสดงความยาวรวงของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1



ภาพที่ 82 ลักษณะต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติอายุ 4 วัน (ก)เปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 และ T_2 (ข และ ค)



ภาพที่ 83 ลักษณะต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติอายุ 10 วัน (ก) เปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน (ข)



ภาพที่ 84 แผนภูมิแสดงความสูงต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ อายุ 10 วัน เปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1

ผลการทดลองที่ 5.6 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์เนื้อเยื่อปลายรากข้าว ที่ผ่านการแช่ในสาร pre-treatment 3 ชนิด ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าปลายรากข้าวพันธุ์ กข6 และชัยนาท 1 ที่แช่ใน 0.002M 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 2.5 ชม. ณ อุณหภูมิ 28°ซ. มีจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสสูงที่สุด คือ 35 และ 30 เซลล์ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสของข้าวแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12)

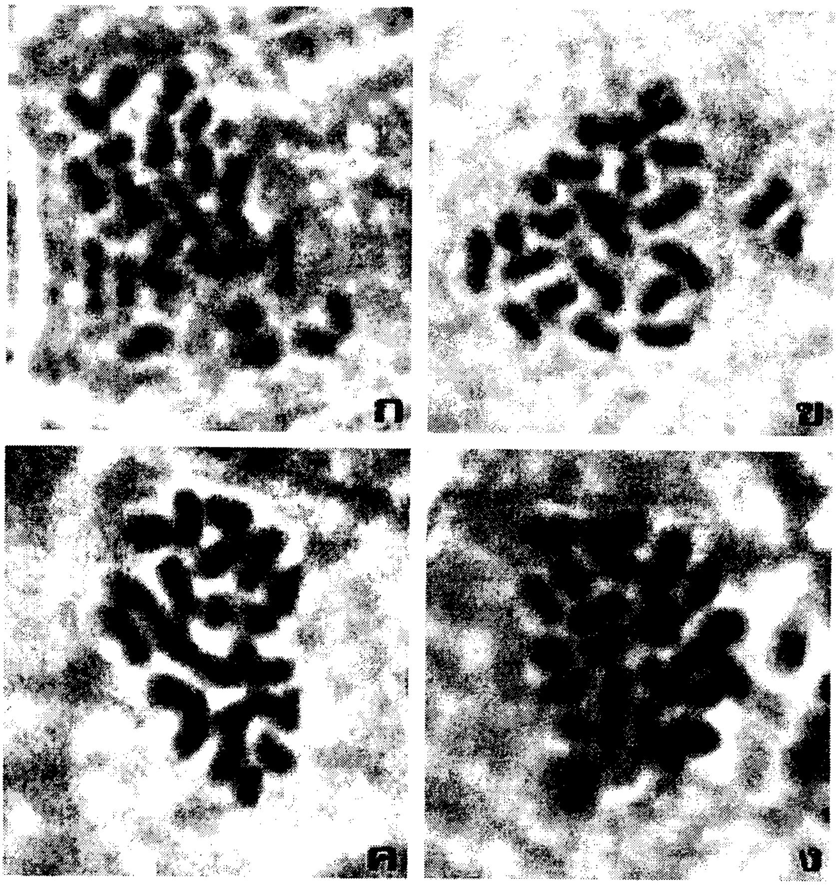
การตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากในระยะเมตาเฟสพบว่าข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติมีมีจำนวนโครโมโซม 2n=24 และเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 T_1 และ T_2 พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=24 เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 85) สำหรับการตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าว

พันธุ์ชัยนาท 1 เปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลง-พันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n=24 (ภาพที่ 86)

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟส โดยนับจากปลายรากข้าวพันธุ์ กข6 และพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ผ่านการ pretreatment ด้วยสารละลายและระยะเวลาต่าง ๆ

	จำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟส	
	พันธุ์ กข 6	พันธุ์ชัยนาท 1
0.2% colchicine 4 ชม. ,4°ซ.	12b	15B
0.002 M 8-hydroxyquinoline 2.5 ชม., 28°ซ.	35a	30A
1% α-bromonapthalene 2 ชม., 28°ซ.	10b	16B

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทดสอบโดยวิธี DMRT

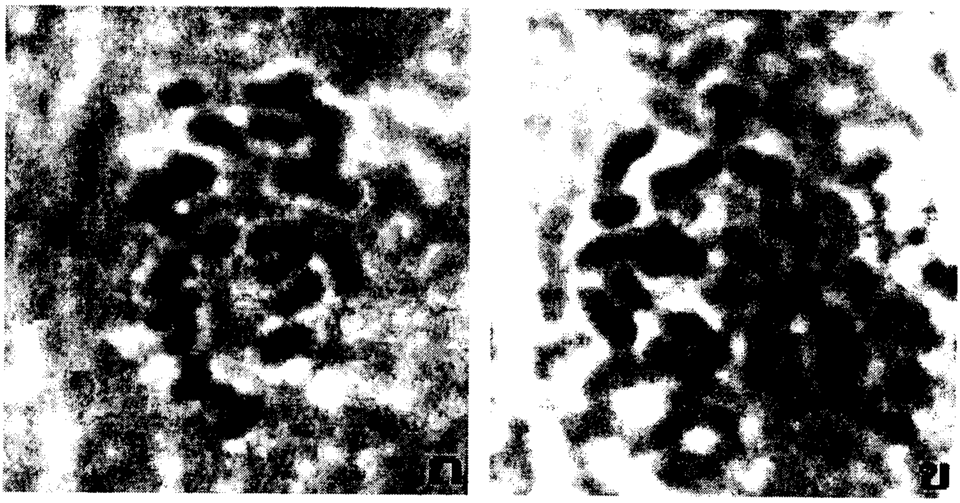


ภาพที่ 85 ก. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข 6 ปกติ (2n=24)

ข. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0(2n=24)

ค. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 (2n=24)

ง. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_2 (2n=24)



ภาพที่ 86 ก. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ปกติ (2n=24)

ข. โครโมโซมระยะเมตาเฟสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซิน(2n=24)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการนำต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 และ T_1 ลงปลูกในดินกระถาง พบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ โดยมีการเจริญเติบโตให้กำเนิดช่อดอก และออกรวงในเวลาใกล้เคียงกัน และสามารถเก็บเมล็ดข้าวรุ่นลูกของต้นข้าวแปลงพันธุ์ได้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 ที่นำปลูกในดินกระถางเป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่าใบข้าวมีการแสดงออกของยีน *gus* และจากการสังเกตพบว่าใบข้าวส่วนใหญ่ที่นำมาตรวจสอบมีการแสดงออกของยีน *gus* ค่อนข้างมาก โดยสังเกตเห็นสีฟ้าตลอดทั้งใบเมื่อเปรียบเทียบกับใบข้าวปกติ การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์พบมีการแสดงออกของยีน *gus* บริเวณคัพภะและเอนโดสเปิร์มของเมล็ด และพบมีการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_1 และ T_2 อายุ 7 วัน ผลการตรวจสอบดีเอนเอที่สกัดจากใบข้าวแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินรุ่น T_0 ด้วยเทคนิด PCR โดยมี CaMV35S เป็นดีเอนเอต้นแบบ พบมี band ขนาด 189 bp ซึ่งตรงกับขนาดที่คาดหวังในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ ดังนั้นต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่นำมาตรวจสอบจึงมีการสอดแทรกของ T-DNA ในจีโนม

ผลการทดสอบอิทธิพลของไฮโกรมัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปกติพบว่าอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2%, ผงวุ้น 0.8% ร่วมกับไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. เป็นอาหารคัดเลือกที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน เนื่องจากอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีผลให้เมล็ดข้าวปกติไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้ การศึกษา segregation pattern ในเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน รุ่น T_0 และ T_1 โดยสุ่มเลือกเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์มาทดสอบการงอกบนอาหารสูตร N_6 ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. พบว่าเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_0 รหัส RD6-hpt2, RD6-hpt4, RD6-hpt5 และ RD6-hpt7 และเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_1 รหัส RD6-htp 2-3, RD6-htp 4-4, RD6-htp4-5 และ RD6-htp 5-1 มีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน/จำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1 ส่วนเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_0 รหัส RD6-hpt3, RD6-hpt6 และ RD6-hpt9 มีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซินเท่ากับ 1:1 อัตราส่วน 3:1 เป็นอัตราส่วนที่เป็นไปตามกฎของเมนเดล และแสดงให้เห็นว่าการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมข้าวเกิดขึ้น ณ ตำแหน่งโลคัสเดียว (single locus) และต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่นพ่อแม่ของเมล็ดเหล่านี้มียีนที่มีลักษณะเป็นลูกผสม Rr (heterozygote) ดังนั้นเมื่อมีการผสมตัวเองเกิดขึ้น รุ่นลูกจะมีลักษณะแตกต่างกันออกไปคือ RR,2Rr:1rr=3:1 โดยมี R เป็นยีนข่ม (dominance gene) และ r เป็นยีนแฝง(recessive gene)

Chen *et al.*(1998) รายงานการทดสอบความต้านทานต่อ bialaphos ในเมล็ดข้าวรุ่นลูกของข้าวสาลีแปลงพันธุ์ และพบว่าเมล็ดมี segregation pattern เท่ากับ 3:1และ 15:1 และอธิบายว่าอัตราส่วน 3:1 เกิดจากการแทรกตัวของ T-DNA ในจีโนมพืช ณ ตำแหน่ง single locus แต่ต้นข้าวที่มี segregation pattern เท่ากับ 15:1 เกิดจากการแทรกตัวของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช ในโลคัสที่แตกต่าง 2 โลคัส

อัตราส่วน 1:1 ที่พบใน RD6-hpt3, RD6-hpt6 และ RD6-hpt9 ไม่เป็นไปตามที่ได้อธิบายมาแล้ว ซึ่งมีรายงานพบอัตราส่วนเดียวกันนี้ในเมล็ดรุ่นลูกในข้าวแปลงพันธุ์หลายชนิด ได้แก่ Zhang *et al.*(1996) รายงานว่า segregation pattern ของเมล็ดรุ่นลูกที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดลนั้น เกิดจากความไม่สมบูรณ์ของละอองเรณูข้าว และส่งผลให้การผสมเกสรเกิดขึ้นต่ำอย่างผิดปกติด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wu *et al.*(1997) ที่ศึกษาการส่งถ่ายยีน *cry1Ab* เข้าสู่ข้าวอินดิกาหลายชนิด และรายงานการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นข้าวรุ่นลูกซึ่งเกิดจากการผสมตัวเองของข้าวรุ่น T_1 ว่ามีอัตราส่วนจำนวนต้นที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ต่อจำนวนต้นไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* แตกต่างไปจากกฎของเมนเดล และอธิบายว่าการเกิด segregation ที่ผิดปกตินี้มีสาเหตุจากความไม่สมบูรณ์ของละอองเรณูของข้าวแปลงพันธุ์มากกว่า จะมีสาเหตุมาจากรูปแบบการแทรกตัว (integration pattern) ของ T-DNA ในจีโนมพืช Bradshaw and Stettler (1994) ศึกษา phenotypic segregation ในเมล็ดข้าวพันธุ์ปกติ หลายชนิดและรายงานพบ segregation pattern ที่แตกต่างไปจากกฎของเมนเดลเช่นเดียวกัน Christou *et al.*(1989) รายงานว่าการเกิด segregation pattern ในลักษณะที่แตกต่างไปจากกฎของเมนเดลอาจเกิดจากความเป็นหมันของเซลล์แกมีต มีรายงานการพบ segregation ของเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์ในลักษณะเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ Mohanty *et al.*(1995) รายงานการส่งถ่ายยีนต้านทานต่อไฮโกรมัยซินเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Pusa Basmati1 โดย *A. tumefaciens* และทดสอบลักษณะต้านทานต่อไฮโกรมัยซินในเมล็ดข้าวรุ่นลูกโดยนำเมล็ดข้าวเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มก./ล. และพบว่าอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัยซิน 3 แบบ คือ 1:1, 3:1 และ 15:1 Uze *et al.*(1997) ทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเมล็ดข้าวรุ่นลูกของข้าวพันธุ์ TP309 ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินพบว่าพืชแปลงพันธุ์มีอัตราส่วนจำนวนเมล็ดที่ต้านทานไฮโกรมัยซินต่อจำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานไฮโกรมัย 2 แบบ คือ 3:1 และ 1:1

ผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ พบว่าค่าศักย์ออสโมติส คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และอัตราส่วนระหว่างคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บีในใบข้าวแปลงพันธุ์และใบข้าวปกติมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ กข6 ปกติ พบว่า ลักษณะต้นกล้าอายุ 4 วัน ความสูงเฉลี่ยต้นกล้าอายุ 10 วัน ความสูงเฉลี่ย ต้นข้าวอายุ 3 เดือน ลักษณะใบธง(ความยาวเฉลี่ย ความ

กว้างเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย/ความกว้างเฉลี่ย) ลักษณะเมล็ด(ความยาวเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย/ความกว้างเฉลี่ย) และลักษณะรวงข้าว(จำนวนรวงต่อต้น จำนวนกิ่งปฐมภูมิต่อรวง จำนวนเมล็ด/รวง ความยาวรวง) ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่จากการเปรียบเทียบค่าความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์รุ่น T_0 และต้นข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์รุ่น T_1 พบว่าความสูงของ ต้นข้าวรุ่น T_0 มีความสูงเฉลี่ยมากกว่าต้นข้าวรุ่น T_1 ประมาณ 30-40 ซม. ทั้งนี้เนื่องจากข้าว พันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสงซึ่งจะเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตจากระยะเติบโต (vegetative phase) ไปเป็นระยะเจริญพันธุ์ (reproductive phase) เพื่อกำเนิดช่อดอก เมื่อได้รับช่วงแสงน้อยกว่าช่วงแสงวิกฤติ (critical day length) หรือประมาณเดือนสิงหาคม แต่ในการทดลองได้นำข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์รุ่น T_0 ลงปลูกตั้งแต่เดือนมิถุนายน จึงทำให้ต้นข้าวมีการเจริญเติบโตระยะเจริญพันธุ์มากกว่าต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ปลูกตามฤดูกาล ส่งผลให้มีความสูงผิดปกติ แต่อย่างไรก็ตามความสูงดังกล่าวไม่แตกต่างกับความสูงของต้นข้าวพันธุ์ กข6 ปกติที่ปลูกในระยะเวลาเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นการสอดแทรกของ T-DNA ในจีโนมของข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์จากการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* EHA105(pCAMBIA1301) ไม่ทำให้ลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของต้นข้าวแปลงพันธุ์เปลี่ยนแปลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Tu *et al.*(2002) ซึ่งประสบความสำเร็จในการสร้างข้าวพันธุ์ IR72 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยต้นข้าวแปลงพันธุ์ ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตรุ่นลูกได้ และจากการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ความสูงต้นข้าว จำนวนรวงต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนักเมล็ดและผลผลิตต่อไร่ของข้าวพันธุ์ IR72 แปลงพันธุ์เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ IR72 ปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Yuan *et al.*(2002) ศึกษาชั่งน้ำหนักต้นกล้าซึ่งเป็นรุ่น T_1 ของต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อโรคไหม้ และพบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นกล้าไม่แตกต่างกับน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นกล้าปกติอย่างมีนัยสำคัญ และเสนอว่าการแสดงออกของยีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวแปลงพันธุ์ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ข้าว และไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของต้นข้าว อย่างไรก็ตามรายงานของ Maddaloni *et al.*(1997) กล่าวว่าได้ทำการส่งถ่ายยีนสำหรับการสังเคราะห์ ribosome-inactivating protein(RIP) ในยาสูบเพื่อทำให้ยาสูบมีลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *Rhizoctonia solani* แต่พบในภายหลังว่าการแสดงออกของยีน RIP ในเซลล์ยาสูบทำให้ไรโบโซมได้รับอันตราย Kisaka *et al.*(1998) ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของต้นข้าวพันธุ์ Yamahushi ปกติกับต้นข้าวพันธุ์ Yamahushi แปลงพันธุ์ที่ได้รับยีน *rgp1* ซึ่งมีรหัสสังเคราะห์ GTP-binding protein รุ่น T_0 และ T_1 และพบว่าต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_0 มีจำนวนรวงเฉลี่ยมากกว่าต้นข้าวปกติ 3 เท่า และมีความสูงเฉลี่ยน้อยกว่าต้นข้าวปกติ 20 ซม. รวมทั้งการออกดอกเกิดขึ้นเร็วกว่าต้นข้าวปกติ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมล็ดข้าวแปลงพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างจากเมล็ดข้าวปกติ และต้นข้าวแปลงพันธุ์รุ่น T_2 มีจำนวนรวงมากกว่าต้นข้าวปกติ 2.6 เท่า

ผลการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของข้าวพันธุ์ กข6 และชัยนาท 1 พบว่าสาร pre-treatment ทั้ง 3 ชนิดชักนำเซลล์ปลายรากข้าวให้เข้าสู่ระยะเมตาเฟสได้แตกต่างกัน โดยการ pre-treatment ปลายรากข้าวด้วย 0.002M 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 2.5 ชม. ณ อุณหภูมิ 28°ซ. ชักนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะเมตาเฟสได้ดีที่สุด ผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าวพันธุ์ กข 6 เปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าวพันธุ์ กข 6 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินรุ่น T_0 T_1 และ T_2 พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=24 เท่ากัน ผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อกานามัยซินรุ่น T_1 พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=24 เท่ากัน ดังนั้นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ กข6 โดย *A. tumefaciens* EHA105(pCAMBIA1301) และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) ไม่ทำให้จำนวนโครโมโซมของข้าวเปลี่ยนแปลง ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Azhankanandam *et al.*(2000) ซึ่งศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Pusa Basmati 1, Taipei309 และ Tiwana โดย *A. tumefaciens* และสามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับต้นข้าวปกติได้ และการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเซลปลายรากข้าวแปลงพันธุ์พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับข้าวปกติคือ 2n=24

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2546. **ข้อมูลเรื่องข้าว.** http://www.disc.doa.go.th. 15 เมษายน 2547.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2532. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ. **วารสารเกษตรศาสตร์.** 23: 324-330.

ประภา ศรีพิจิตต์ และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. **วารสารเกษตรศาสตร์.** 28: 27-37.

ประภา ศรีพิจิตต์, อรอนงค์ นัยวิกุล และ วิทยา แสงแก้วสุข. 2537. การปรับปรุงข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยชักนำให้คัพภะสร้างยอดจำนวนมากร่วมกับรังสีแกมมา. **วารสารเกษตรศาสตร์.** 28: 180-192.

ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, รัตนา เลิศวิชัย, สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, กาญจนา กล้าแข็ง, ประภา ศรีพิจิตต์, ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, สุพจน์ เฟื่องฟูพงศ์ และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2538. การเพาะเลี้ยงอับเกสรของข้าวลูกผสม (ขาวดอกมะลิ 105/สไคบอนเนท). **วารสารเกษตรศาสตร์.** 29: 158-166.

ทศพร พิพัฒน์ภานุกูล. 2541. **การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ กข6 โดย *A. tumefaciens.*** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระรื่น บุญดวง และ สมพล อุชชิน. 2533. **เอกสารแนะนำข้าวและธัญพืชเมืองหนาว.** งานเอกสารวิชาการฝ่ายอบรม สถาบันวิจัยข้าว. กรุงเทพฯ

สำลี บุญวัฒนา. 2537. **พันธุ์ข้าว กข ของไทย.** ฝ่ายฝึกอบรม สถาบันวิจัยข้าว, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เลิศลักษณ์ เงินศิริ และ พรรณณี รอดแรงบุญ. 2537. การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ. **วารสารเกษตรศาสตร์.** 28: 92-98.

สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร. 2536. **แบคทีเรียพื้นฐาน.** โรงพิมพ์ยอดศิริ. กรุงเทพฯ.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2541. **การส่งถ่ายยีนในพืชชั้นสูง.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Afza, R., Shen, M., Zapata-Arias, F. J., Xie, J., Fundi, H. K., Lee, K.-S., Bobadilla-Mucino, E., and Kodym, A. 2000. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. **Plant Science.** 153: 155-159.

Aldemita, R. R., and Hodge, T. K. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. **Planta.** 199: 612-617.

Alfonso-Rubi, J., Carbonero, P., and Diaz, I. 1999. Parameters influencing the regeneration capacity of callues derived from mature indica and tile japonica rice seeds after microprojectile bombardment. **Euphytica.** 107: 115-122.

Alt-Morbe, J., Kuhlmann, H., and Schroder, J. 1989. Differences ininduction of Ti plasmid virulence gene *virG* and *virD* and continued control of *virD* expression by four external factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** 2: 301-308.

Ansari, A., and Gartenberg, and M. R. 1999. Persistence of an alternate chromatin structure at silenced loci *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 96: 343-348.

Ayres, N. M., and Park, W. D. Genetic transformation of rice. 1994. **Critical Review in Plant Science.** 13: 219-239.

Azhakanandam, K., Mc Cabe, M. S., Power, J. B., Lowe, K. C., Cocking, E. C., and Davey, M. R. 2000. T-DNA transfer, integration, expression and inheritance in rice: effect of plant genotype and *Agrobacterium* super-virulence. **Journal of Plant Physiology.** 157: 429-439.

Bako, L., Umeda, M., Tiburcio, A. F., Schell, J., and Koncz, C. 2003. The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-tranferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 100: 10108-10113.

Barker, R., Idler K., Thomson, D., and Kemp, J. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi 15955. **Plant Molecular Biology.** 2: 335-350.

Barrett, C., and Cassells, A. C. 1994. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. Pelargonii (Brown) from *Pelargonium domesticum* cv. "Grand Slam" explant *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 36: 169-175.

Baruah-Wolff, J., Harwood, W. A., and Lonadale, D. A. 1999. Luciferase as a reporter gene for transformation studies in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports.** 18: 715-720.

Bhaskaran, S., and Smith, R. H.. 1990. Regeneration in cereal tissue culture, a review. **Crop Sciences.** 30: 1328-1336.

Bidney, D., Sacelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., and Huffman, G. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increase transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology.** 18: 301-313.

Bishnoi, U., Jain, R. K., Rohilla, J. S., Chowdhury, V. K., Gupta, K. R., and Chowdhury, J. B. 2000. Anther culture of recalcitrant indica×Basmti rice hybrids. **Euphytica.** 114: 93-101.

Biswas, G. C. G. 1994. Transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.) plants obtained by direct gene transfer to protoplasts. **Journal of Biotechnology.** 32: 1-10.

Biswas, G. C. G., Chen, D.-F., and Elliott, M. 1998. A routine system for generation of transgenic rice(*Oryza sativa* L.) plants by microprojectile bombardment of embryogenic cell clusters. **Plant Science.** 133: 203-210.

Bradshaw, H. D., and Stettler, R. F. 1994. Molecular genetic of growth and development in *Populus*. 2. Segregation distortion due to genetic load. **Theoretical and Applied Genetics.** 89: 551-558.

Braun, A. C. 1958. A physiologycal basis for autonomous growth of crown gall tumor cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 44: 344-349.

Breitler, J.-C., Labeyrie, A., Meynard, D., and Legavre, T. 2002. Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. **Theoretical and Applied Genetics.** 104: 709-719.

Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Aubourg, S., Samson, F., Chauvin,S., Bechtold, N., Cruaud, C., DeRose,R., Pelletier, G., Lepiniec, L., Caboche, M., and Lecharny, A. 2002. T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. **EMBO Reports.** 3: 1152-1157.

Buchanan-Wollaston, V., Passatore, J. E., and Cannon, F. 1987. The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. **Nature.** 328: 172-175.

Canglosi, G. A., Martinett, G., Leigh, J. A., Lee, C. C., Theines, C., and Nester, E. W. 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens ChvA* protein in export of β-1,2 glucan. **Journal of Bacteriology.** 171: 1609-1615.

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

Chan, M. T., Chang, H. H., Ho., S.L., Tong, W. F., and Yu, S. M. 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promotor/beta-glucuronidase gene. **Plant Molecular Biology.** 22: 491-506.

Chaudhury, A., Maheshwari, S. C., and Tyagi, A. K. 1995. Transient expression of *gus* gene in intact seed embryos of indica rice after electroporation-mediated gene delivery. **Plant Cell Reports.** 14: 215-220.

Chen, W. P., Gu, X., Liang, G. H., and Muthukrishnan, S. 1998. Introduction and constitutive expression of rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. **Theoretical and Applied Genetics.** 97: 1296-1306

Cheng, Z.-M., Schnurr, J. A., and Kapaun, J. A. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. **Plant Cell Reports.** 17: 646-649.

Chia, T., Chan, Y., and Chua, N. 1994. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. **Plant Journal.** 6: 441-446.

Chilton, M. D., Drummond, M. H., Mrelo, D. J., Montoya, A. L., Gordon, M. P., and Nester, E. W. 1997. Stable incorperation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall and tumerigenesis. **Cell.** 11: 263-271.

Cho, M. J., Jiang, W., and Lemaux, P. G. 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. **Plant Science.** 138: 229-244.

Christensen, A. H., Sharrock, R. A., and Quail, P. H. 1992. Maize polyubiquitin gene: structure, thermal pertubation of expression and transcrip splicing, and promotor activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology.** 18: 675-689.

Christou, P., Swain, W. F., Yang, N.-S., and McCabe, D. E. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 86: 1991-1995.

Chuenboonngarm, N., Charoonsote, S.,and Bhamarapravati, S. 2001. Effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Elli *in vitro* culture. **Science Asia.** 27:137-141

Citovsky, V., De Vos, G., and Zambryski, P. 1988. Single-stranded DNA binding protein encoded by the *virE* locus of *Agrobacterium tumefaciens*. **Science.** 240: 501-504.

Clontech Laboratories. **Clontech 94/95.** USA.: n.p., 1994.

Cornejo, M.J., Luth, D., Blankenship, K.M., Anderson, O.D., and Blechl, A.E. 1993. Activity of a maize ubiquitin promotor in transgenic rice. **Plant Molecular Biology.** 23: 567-581.

Dai, S., Carcamo, R., Zhang, Z., and Chen, S. 2001. The bacterial cytosine deaminase gene used as a conditional negative selection marker in transgenic rice plants. **Plant Cell Reports.** 20: 738-743.

Dale, E. C., and Ow, D. W. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 88: 10558-10562.

Datta, S. K., Datta, K., Soltanifar, N., Donn, G., and Potrykus, I. 1992(a). Herbicide-resistance indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. **Plant Molecular Biology.** 20: 619-629.

Datta, K., Potrykus, I., and Datta, S. K. 1992(b). Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of indica rice breeding line IR72 (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports.** 11: 229-233.

Datta, K., Koukolikova-Nicola, Z., and Baisakh, N. 2000. *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystem. **Theoretical and Applied Genetics.** 100: 822-839.

Davey, M. R., Curtis, I. S., Gartland, K. M. A., and Power, J. B. 1994. **Plant galls.** Michele A.J. Williams(Ed.). Systematic Association Special Volume No. 49. Clarendon Press, Oxford.

Davinder, S., Minocha, J. L., and Singh, D. 1993. Efficiency of diferent explants and media for callus induction and plant regeneration in Basmati rice. **Crop Improvement.** 20: 139-142.

Dekeyser, R., Claes, B., Marichal, M., Montagu, M. V., and Caplan, A. 1989. Evaluation of selectable marker for rice transformation. **Plant Physiology.** 90: 217-223.

Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., and Guern, J. 1996. Comparison of mechanism controlling uptake and accumulation of 2,4-D, naphthalene-1-acetic acid, and

indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. **Planta.** 198: 532-541.

Deng, W., Chen, L., Wood, D. W., Metcalfe, T., Liang, X., Gordon, M. P., Comai, L., and Nester, E. W. 1998. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 95: 7040-7045.

Dillen, W., DeClereg, J., Kapila, J., Zambre, M., Van Montagu, M., and Angenon, G. 1997. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **Plant Journal.** 12: 1459-1463.

Ditt, R. F., Nester, E. W., and Comai, L. 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 98: 10954-10959.

Dodds, J. H., and Robert, L. W. 1981. Some inhibitory effects of gentamycin on plant tissue culture. **In Vitro.** 17: 467-470.

Dong, J., Teng, W., Buchholz, W. G., and Hall, T. C. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of javanica rice. **Molecular Breeding.** 2: 267-276.

Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A., and Nester, E. W. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. **Journal of Bacteriology.** 161: 850-860.

Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E., and Endo, S. 2001. Systems for the removal of a selectable maker and their combination with a positive marker. **Plant Cell Reports.** 20: 383-392.

Endo, S., Sugita, K., Sakai, M., Tanaka, H., and Ebinuma, H. 2002. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system. **Plant Journal.** 30: 115-122.

Enriquez-Obregon, G. A., Prieto-Samsonov, D. L., de la Riva, G. A., Perez, M., Selman-Housein, G., and Vazquez-Padron, R. I. 1999. *Agrobacterium*-mediated japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 59: 159-168.

Frame, B. R., Shou, H., Chikwamba, R. K., Zhang, Z., and Xiang, C. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology.** 129: 13-22.

Ghorbel, R., and Juarez, J. 1999. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. **Theoretical and Applied Genetics.** 99: 350-358.

Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., and Newbury, H. J. 1991. The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Reports.** 9: 671-675.

Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., and Ulian, E. C., Peterson, G., and Smith, R. H. 1991. Transformation of *Zea may* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. **Plant Physiology.** 65: 426-434.

Gupta, H. S., and Pattanayak, A. 1993. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). **Bio/Technology.** 11: 90-94.

Hauptmann, R. M., Vasil, V., Ozias-Akin, P., Tabaeizadeh, Z., Rogers, G., Fraley, R. T., Horch, R. B., and Vasil, I. K. 1988. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae. **Plant Physiology.** 86: 602-606.

Havey, A., Moisan, L., Lindup, S., and Lonsdale, D. 1999. Wheat regenerated from scutellum callus as a source of material for transformation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 57: 153-156.

Hayashimoto, A., Li, Z., and Murai, N. 1990. A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants. **Plant Physiology.** 93: 857-863.

Hernalsteens, J.-P., Thai-tong, L., Schell, J., and Van Montagu, M. 1984. An *Agrobacterium* transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. **EMBO Journal.** 3: 3039-3041.

Herrera-Estrella, L. 1999. Transgenic plants for tropical regions:some considerations about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 96: 5978-5981.

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

Higo, K., and Higo, H. 1996. Cloning and characterization of the rice *cat A* catalase gene, a homologue of the maize *cat3* gene. **Plant Molecular Biology.** 30: 505-521.

Hoa, T. T. C., Al-Babili, S., Schaub, P., Potrykus, I., and Beyer, P. 2003. Golden indica and japonica rice lines amenable to deregulation. **Plant Physiology.** 133: 161-169.

Holm, P. B., Knudsen, S., Mouritzen, P., Negri, P., Olsen, F. L., Roue, C. 1994. Regeneration of fertile barley plant from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. **Plant Cell.** 6: 531-543.

Hooykaas, P. J. J. 1989. Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. **Plant Molecular Biology.** 13: 327-336.

Hooykaas, P. J. J., and Schilperoot, R. A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. **Plant Molecular Biology.** 19: 15-38.

Hooykaas-Van Slogteren, G. M. S., Hooykaas, P. J. J., and Schilperoot, R. A. 1984. Expression of Ti plasmid gene in monocotyledonous plant infected with *Agrobacterium tumefaciens.* **Nature.** 311: 763-764.

Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Takabe, A., and Takabe, T. 2000. Enhanced tolerance to salt stressed in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology.** 43: 103-111.

Hossain, B., Hirata, N., Nagatomo, Y., Akashi, R., and Takaki, H. 1997. Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture. **Journal of Plant Growth Regulation.** 16: 239-243.

Howard, E., Zupan, J., Citovsky, V., and Zambrisky, P. 1992. The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bibartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. **Cell.** 68: 109-118.

Horvath, H., Rostocks, N., Brueggeman, R., Steffenson, B., and von Wettstein, D. 2003. Genetically engineered stem rust resistance in barley using the *Rpg1* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 100: 364-369.

Hu, C. Y., Chee, P. P., Chesney, R. H., Zhou, J. H., Miller, P. D., and O'Brien, W. T. 1990. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. **Plant Cell Reports.** 9: 1-5.

Hwang, Y.-S., Nichol, S., Nandi, S., and Jernstedt, J. A. 2001. Aleurone-and embryo-specific expression of the beta-glucuronidase gene controlled by the barley *Chi26* and *Ltp1* promotors in transgenic rice. **Plant Cell Reports.** 20: 647-654.

Hwang, Y.-S., Yang, D., and McCullar, C. 2002. Analysis of the rice endosperm-specific globulin promotor in transformed rice cells. **Plant Cell Reports.** 20: 842-847.

Iglesias, V., Moscone, E., Papp, I., Neuhuber, F., and Michalowski, S. 1997. Molecular and cytogenetic analyses of stable and unstably expressed transgene loci in tobacco. **Plant Cell.** 9: 1251-1264.

Ingram, H. M., Power, J. B., Lowe, K. C., and Davey, M. R. 1999. Optimisation of procedures for microprojectile bombardment of microspore-derived embryo in wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 57: 207-210.

Iyer, L. M., Kumpatla, S. P., Chandrasekharan, M. B., and Hall, T. C. 2000. Transgene silencing in monocots. **Plant Molecular Biology.** 43: 323-346.

Jahne, A., and Lorz, H. 1995. Cereal microspore culture. **Plant Science.** 109: 1-12.

Jain, R. K., Jain, S., and Wu, R. 1996. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic indica rice varieties.1996. **Plant Cell Reports.** 15: 449-454.

James, D. J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri, P., Viss. P., and Dandekar, A. M. 1993. Acetosyringone and osmoprotectants betain-like or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. **Plant Cell Reports.** 12: 559-563.

Jefferson, R. A., Burgess, S. M., and Hirsh, D. 1986. β-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 83: 8447-8451.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. 1987. Gus fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. **EMBO Journal.** 6: 3901-3907.

Jin, S., Roitsch, T., Christie, P. J., and Nester, W. 1990. The regulation VirG protein specifically binds to a *cis*-acting regulatory seguence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. **Journal of Bacteriology.** 172: 531-537.

Jin, W.-W., Li, Z.-Y., Fang, Q.,Altosaar, I., Liu, L.-H., and Song, Y.-C. 2002. Fluorescence *in situ* hybrydization analysis of alien genes in *Agrobacterium* mediated *cryA(b)*-transformed rice. **Annals of Botany.** 90: 31-36.

Jose Pons, M., Marfa, V., Mele, E., and Messeguer, J. 2000. Regeneration and transformation of Spanish rice cultivars using mature embryos. **Euphytica.** 114: 117-122.

Kranz, E., von Wiegen, P., and Lorz, H. 1995. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following in vitro fertilization with angiosperm gametes. **Plant Journal.** 8:9-23.

Ke, J., Khan, R., and Johnson, T. 2001. High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens.* **Plant Cell Reports.** 20: 150-156.

Kisaka, H., Sano, H., and Kameya, T. 1998. Characterization of transgenic rice plants that express rpg1, the gene for a small GTP-binding protein from rice. **Theoretical Applied Genetics.** 97: 810-815.

Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A.,Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M.,Fukuda, H., Nomura, K., and Fujimura, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology.** 28: 11-14.

Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., and Kumashiro, T. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant Journal.** 10: 165-174.

Kucherenko, L. A. 1993. Callusogenesis, yield and characteristics of rice plants regenerants in tissue culture as related to hormonal composition of inducting media. **Soviet Agricultural Science.** 4: 1-5.

Kunanuvatchaidach, R., Godwin, I. D., and Adkins, S. W. 1995. High efficiency plant regeneration form callus induced on mature indica rice caryopses. **Australian Journal of Botany.** 43: 337-348.

Lee, S.-H., Shon, Y. G., Kim, C. Y., Chun, H. J., Cheong, Y. H., Kim, Z. H., Choe, Z. R., Choi, Y. J., and Cho, M. J. 1999. Variations in the morphology of rice plants regenerated from protoplasts using different culture procedure. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 57: 179-187.

Leifert, C., Waites, W. M., and Nicholas, J. R. 1989. Bacterial contamination of micropropagation plant cultures. **Journal of Applied Bacteriology.** 67: 353-361.

Leifert, C., Waites, B., Keetley, J. W., Wright, S. M., Nicholas, J. R., and Waites, W. M. 1994. Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminations in *Delphinium* tissue cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 36: 149-155.

Lentini, Z., Reyes, P., Martinez, C. P., and Roca, W. M. 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. **Plant Science.** 110: 127-138.

Lewin, B. 1990. **Gene IV.** Oxford University Prees, Oxford.

Li, X. Q., Liu, C. N., Ritchie, S. W., Peng, J. Y., Gelvin, S. B., and Hodges, T. K. 1992. Factor influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *gusA* in rice. **Plant Molecular Biology.** 20: 1037-1048.

Li, H., Machii, H., Hagio, T., Takezaki, A., and Hirabayashi, T. 1999. Plant regeneration from protoplasts of *Triticum aestivum* L. cv. Nakasoushu. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 58: 119-125.

Libiakova, G., Jorgensen, B., and Palmgren, G. 2001. Efficacy of an intron-containing kanamycin resistance gene as a selectable marker in plant transformation. **Plant Cell Reports.** 20: 610-615.

Lin, J.-J., Assad-Garcia, N., and Kuo, J. 1995. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science.** 109: 171-177.

Liu, C. N., Li, X. Q., and Gelvin, S. B. 1992. Multuple copies of virG enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissue by *Agrobacterium tumefaciens.* **Plant Molecular Biology.** 20: 1071-1087.

Lucca, R., Hurrell, R., and Potrykus, I. 2001. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grain. **Theoretical and Applied Genetics.** 102: 392-397.

Lutts, S., Kinet, J. M., and Bouharmont, J. 1999. Improvement of rice callus regeneration in the presenceof NaCl. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 57: 3-11.

Lyznik, A. L., Ryan, R. D., Ritchie, S. W., and Hodges, K. 1989. Stable co-transformation of maize protoplast with *gusA* neo genes. **Plant Molecular Biology.** 13: 151-161.

Maddaloni, M., Forlani, F., Balmas, V., Donini, G., Stasse, L., Corazza, L., and Motto, M. 1997. Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. **Transgenic Research.** 6: 393-402.

Maeda, E. 1980. Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition (part I). **Japan Association for Quaternary Research.** 14: 4-8.

Mandal, A., Lang, V., and Palva, E. T. 1993. Improved efficiency for T-DNA-mediated transformation and plasmid rescue in *Arabidopsis thaliana*. **Theoretical and Applied Genetics.** 86: 621-628.

Mandal, A., Sandgren, M., and Palva, E. T. 1994. Inhibition of cytosine methylation allows efficient clonning of T-DNA tagged plant DNA of *Arabidopsis thaliana* by plasmid rescue. **In Vitro Cellular & Developmental Biology.** 30: 204-209.

Mandal, N., and Gupta, S. 1995. Effect of genotype and culture medium on androgenic callus formation and green plant regeneration in indica rice. **Indian Journal of Experiment Biology.** 33: 761-765.

Marassi, M. A., Bovo, O. A., Scoccihi, A., and Mroginski, L. A. 1996. Cytokinins in the callus induction medium for plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) var. Basmati 370. **Phyton Buenos Aires.** 59: 155-160.

Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Crameri, A., Angelis, K., Redel, G. P., Schell, J., Hohn, B., and Koncz, C. 1991. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. **EMBO Journal.** 10: 697-704.

McCormac, A. C., Wu, H., Bao, M., Wang, Y., Xu, R., Elliot, M. C., and Chen, D.-F. 1998. The use of visual marker gene as a cell-specific reporter of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum astivum* L.) and barley(*Hordeum vulgaris* L.). **Euphytica.** 99: 17-25.

Mitsuoka, K., Honda, H., Xing, X. H., and Unno, H. 1994. Effect of intracellular 2,4-D concentration on plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 42: 364-366.

Mohanty, A., Sarma, N. P., and Tyagi, A. K. 1999. *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 and transmission of the transgenes to R2 progeny. **Plant Science.** 147: 127-137.

Morita, M., Xing, X. H., and Unno, H. 1999. Synchronized shoot regeneration of rice(*Oryza sativa* L.) calli on solid medium by adjustment of intracellular 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration. **Plant Cell Reports.** 18: 633-639.

Nandadeva, Y. L., Lupi, C. G., and Meyer, C. 1999. Microprojectile-mediated transient and integrative transformation of rice embryogenic suspension cells: effect of osmotic cell conditioning and of the physical configuration of plasmid DNA. **Plant Cell Reports.** 18: 500-504.

Narashihulu, S. B., Deng, X. B., Sarria, R., and Gelvin, S. B. 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. **The Plant Cell.** 8: 873-886.

Nauerby, B., Billing, K., and Wyndaele, R. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science Limerick.** 123: 169-177.

Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A. R. 2000. The use of phosphomanose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea may* L.) via *Agrobacterium* transformation. **Plant Cell Reports.** 19: 798-803.

Nisch, J. P., and Nisch, C. 1969. Haploid plants from pollen grain. **Science.** 163: 85-87.

Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M., and Hibi, T. 1999. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. **Theoretical and Applied Genetics.** 99: 383-390.

Nuutila, A. M., Villiger, C., and Oksman-Caldentey, K. M. 2002. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat(*Avena sativa* L.) leaf-base segments: influence of nitrogene balance, sugar and auxin. **Plant Cell Reports.** 20: 1156-1161.

Oinam, G. S., and Kothari, S. L. 1933. Genotypic differences in embryogenic callus formation and plant regeneration in indica rice. **International Rice Research Notes.** 18: 9-10.

Palmgren, G., Mattson, O., and Okkels, F. T. 1993. Treatment of *Agrobacterium* or leaf disks with 5-azacytidine increases transgene expression in tobacco. **Plant Molecular Biology.** 21: 429-435.

Pande, H., and Bhojwani, S. S. 1999. Promotion of androgenesis in rice anther cultures by substitution of sucrose with maltose and manitol. **Biologia Plantarum.** 42: 125-128.

Pandey, S. K., Ramesh, B., and Gupta, P. K. 1994. Study on effect of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration in rice(*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding.** 54: 293-299.

Park, S. H., Pinson, S. M. R., and Smith, R. H. 1996. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *A. tumefa*ciens inoculation of isolated shoot apices. **Plant Molecular Biology.** 32: 1135-1148.

Pawloski, P. W., and Somer, D. 1998. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 95: 12106-12110.

Pellegrineschi, A., Brito, R. M., and Velazquez, L. 2002. The effect of pre-treatment with mild heat and drought stresses on the explant and biolistic transformation frequency of three durum wheat cultivars. **Plant Cell Reports.** 20: 955-960.

Peng, J., Kononowicz, H., and Hodges, T. K. 1992. Transgenic indica rice plants. **Theoretical and Applied Genetics.** 83: 855-863.

Peng, J. Y., Wen, F. J., Lister, R. L., and Hodge, T. K. 1995. Inheritance of neo gene in transgenic rice. **Plant Molecular Biology.** 27: 91-104.

Peralta, E. G., Hellmiss, R., and Ream, W. 1986. Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumor-inducing plasmid. **EMBO Journal.** 5: 1137-1142.

Pih, K. T., Yoo, J. H., Fosket, D. E., and Han, I. S. 1996. A comparison of the activity of three cauliflower mosaic virus 35S promotors in rice seedlings and tobacco (BY-2) protoplasts by analysis of *gus* reporter gene transient expression. **Plant Science Limerick.** 114: 141-148.

Ponappa, T., Brzozowski, A. E., and Finer, J. J. 2000. Transient expression and stable transformation of soybean using jellyfish green fluorescent protein (GFP). **Plant Cell Reports.** 19: 6-12.

Pons, M. J., Marfa, V., Mele, E., and Messeguer, J. 2000. Regeneration and genetic transformation of spanish rice cultivars using mature embryos. **Euphytica.** 114: 117-122.

Pullman, G. S., Zhang, Y., and Phan, B. H. 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. **Plant Cell Reports.** 22: 96-104.

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

Raman, R., Chahal, G. S., and Dhalwal, H. S. 1994. Screening of genotype for callus induction and plant regeneration in rice. **Journal of Plant Physiology.** 21: 30-36.

Ramanathan, V., and Veluthambi, K. 1995. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobactrium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T_L-DNA. **Plant Molecular Biology.** 28: 1149-1154.

Ramanathan, V., and Veluthambi, K. 1996. Analysis of octopine left border-directed DNA transfer from *Agrobacterium* to plants. **Journal of Bioscience.** 21: 45-46.

Rance, I. M., Tian, W., Mathew, H., Kochko, A., Beachy, R. N., and Fauquet, C. 1994. Partial dessication of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. **Plant Cell Reports.** 13: 647-651.

Rao, K. V. 1995. Transient gene expression in electroporated immature embryo of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology.** 147: 71-74.

Rathor, K. S., Chowdhury, V. K., and Hodge, T. K. 1993. Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide resistance rice plants from protoplasts. **Plant Molecular Biology.** 21: 871-884.

Rueb. S., Lenemana, M., Schilperoort, R. A., and Hensgens-Lam. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos(*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 32: 259-264.

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

Sahasrabudhe, N. A., Nandi, M., and Bahulikar, R. A. 1999. Influence of boric acid on somatic embryogenesis of a cytosterile line of indica rice. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 58: 73-75.

Schackelford. N. J., and Chlan, C. A. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens.* **Plant Molecular Biology Report.** 14: 50-57.

Schafer, W., Gorz, A., and Kahl, G. 1987. T-DNA integration and expression in monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. **Nature.** 327: 529-532.

Scott, P., and Lyne, R. L. 1994. The effect of different carbohydrate source upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 36: 129-133.

Severin K., and Schoeffl. 1990. Heat-inducible hygromycin-resistance in transgenic tobacco cell culture transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology.** 15: 827-833.

Sheng, J., and Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell.** 8: 1699-1710.

Shimanoto, K., Terada, R., and Izawa, T. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. **Nature.** 338: 274-276.

Skoog, F., and Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **In the Biological Action of Growth Substance.** Porter, H.K.(Ed.). 118-131.

Sporlein, B. 1991. Lipofectin: direct gene transfer to higher plants using cationic liposome. **Theoretical and Applied Genetics.** 83: 1-5.

Stachel, S. E., Messens, E., Montagu, M. V., and Zambriski, P. 1985. Identification of the single molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature.** 318: 624-629.

Stahl, R., Horvath, H., Van Fleet, J., Voetz, M., von Wettstein, D., and Wolf, N. 2002. T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 99: 2146-2151.

Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., and HanBler, G. 1997. Transfer of a grapevine stilbene gene to rice(*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports.** 16: 668-673.

Stewart Jr., C. N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. **Plant Cell Reports.** 20: 376-382.

Su, R. C., Rugert, M. L., and Hodges, T. K. 1992. Fertile indica and japonica rice plants regenerated from embryogenic haploid suspension cultures. **Plant Cell Reports.** 12: 45-49.

Sun, Z. X., Si, H. M., Zhan, X. Y., Chen, S. H., You, C. B., Chen, Z. L., and Ding, Y. 1992. The effect of thermo-photo period for donor plant growth on anther culture of indica rice. In: **Biotechnology in Agriculture Proceedings of the First Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology.** pp. 361-364. Beijing.

Sun, Z. X., Si, H. M., Chen, S. H., and Zhan, X. Y. 1993. Effect of maltose on efficiency of anther culture of rice. **Chineses Journal of Rice Science.** 7: 227-231.

Tada, Y., Sakamoto, M., and Fujimura, T. 1990. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants: use of lectroporation buffer lacking chloride ions. **Theoretical and Applied Genetics.** 80: 475-480.

Tang, K., Sun, X., An, D., Power, J. B., Cocking, E. C., and Davey, M. R. 2000. Plant regeneration from protoplasts of a commercial Asian long-grain javanica rice. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 60: 79-82.

Tinland, B., Hohn, B., and Puchta, H. 1994. *Agrobacterium tumefaciens* transfer single stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 91: 8000-8004.

Toki, S., Takamatsu, S., Nojiri, C., Ooba, S., Anzai, H., Iwata, M., Christensen, A. H., Quail, P. H., and Uchimiya, H. 1992. Expression of a maize ubiquitin gene promotor-*bar* chimeric gene in transgenic rice plants. **Plant Physiology.** 100: 1503-1507.

Tsugawa, H., and Suzuki, M. 2000. A low-temperature method for maintaining plant regeneration activity in embryogenic callus of rice(*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports.** 19: 371-375.

Tsugawa, H., Otsuki, Y., and Suzuki, M. 1998. Efficient transformation of rice protoplasts mediated by synthetic polycationic amino polymer. **Theoretical and Applied Genetics.** 97: 1019-1026.

Tu, J., Datta, K., Khush, G. S., Zhang, Q., and Datta, S. K. 2000. Field performance of Xa21 transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.), IR72. **Theoretical and Applied Genetics.** 101: 15-20.

Umoto, H. S., Croughan, S. S., and Croughan, T. P. 1995. Suspension and protoplast culture of U.S. rice cultivars. **Plant Cell Reports.** 15: 34-37.

Uze, M., Wunn, J., Puonti-Kaerlas, J., Potrykus, I., and Sautter, C. 1997. Plasmolysis of precultured immature embryos improves *Agrobacterium*-mediated gene transfer to rice(*Oryza sativa* L.). **Plant Science.** 130: 87-95.

Vain, P., Finer, K. R., Engler, D. E., Pratt, R. C., and Finer, J. J. 1996. Intron mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea may*) and bluegrass (*Poa pratensis* L.). **Plant Cell Reports.** 15: 489-494.

Vain, P., Worland, B., Kohli, A., Snape, J., Christou, P. 2000. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. **Theoretical and Applied Genetics.** 96: 164-169.

Van Haaren, M. J. J., Sedee, N. J. A., Schilperoort, R. A., and Hooykaas, P. J. J. 1987. Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens.* **Nucleic Acids Research.** 15: 8983-8997.

Vasil, I. K. 1994. Molecular improvement of cereals. **Plant Molecular Biology.** 25: 925-937.

Vijayachandra, K., Palanichelvam, K., and Veluthambi, K. 1995. Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens vir* genes and T-strand generation. **Plant Molecular Biology.** 29: 125-133.

Wang, A. S., Evans, R. A., Altendorf, P. R., Hanten, J. A., Doyle, M. C., and Rosichan, J. L. 2000. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. **Plant Cell Reports.** 19: 654-660.

Ward, E. R., and Barnest, W. M. 1988. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5′ end of T-strand DNA. **Science.** 242: 927-930.

Wassom, J. J., Mei, C., Rocheford, T. R., and Widholm, J. M. 2001. Interaction of environment and ABA and GA treatments on the maize anther culture response. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 64: 69-72.

Wu, C., Fan, Y., Zhang, C., Oliva, N., and Datta, S. K. 1997. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIA*(b) gene resistant to yellow stem borer. **Plant Cell Reports.** 17: 129-132.

Xu, D. P., McElroy, D., Thornburg, R. W., and Wu, R. 1993. Systemic induction of a potato *pin2* promotor by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology.** 22: 573-588.

Xue, Q. Z., Farle, E. D., and Xue, Q. Z. 1995. Plant regeneration from protoplasts of plasmic male sterile line of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports.** 15: 76-81.

Yang, Y. S., Zheng, Y. D., Chen, Y. L., and Jian, Y. Y. 1999. Improvement of plant regeneration from long-term cultured calluses of Taipei309, a model rice variety in *in vitro* studies. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 57: 199-206.

Yara, A., Otani, M., Kusumi, K., Matsuda, O., Shimada, T., and Iba, K. 2001. Production of transgenic japonica rice(*Oryza sativa*) cultivar, Taichung 65, by the *Agrobacterium*-mediated method. **Plant Biotechnology.** 18: 305-310.

Yokoi, S., Tsuchiya, T.,Toriyama, K., and Hinata, K. 1997. Tapetum-specific expression of the *Osg6B* promotor-beta-glucuronidase gene in transgenic rice. **Plant Cell Reports.** 16: 363-367.

Yuan, H., Ming, X., Wang, L., Hu, P., An, C., and Chen, Z. 2002. Expression of a gene encoding trichosanthin in transgenic rice plants enhances resistance to fungus blast disease. **Plant Cell Reports.** 2002: 992-998.

Zambryski, P.C. 1992. Chronicles from the *A. tumefaciens*-plant cell DNA story. **Annual Review of Plant Molecular Biology.** 43: 465-490.

Zapata, F. J., Aldemita, R. R., Ella, E. S., and Cho, M. S. 1990. Isolate microspore culture of rice at the International Rice Reserch Institute. In: **Proceeding of the Second International Rice Genetics Symposium.** pp. 311-319.

Zhang, S. P., and Zhang, S. P. 1995. Efficiency plant regeneration from indica (group1) rice protoplasts of one advanced breeding line and three varities. **Plant Cell Reports.** 15: 68-71.

Zhang, L., Hattori, K., and Zhang, L. 1996. Genetic analysis of regeneration ability in rice seed-callus. **Gene & Genetics System.** 71: 313-317.

Zhang, J., Dong, W. H., Galli, A., and Potrykus, I. 1999. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice(*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports.** 19: 128-132.

Zheng, M. Y., Weng, Y., Liu, W., and Konzak, C. F. 2002. The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat(*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell Reports.** 20: 802-807.

Zhoa, J., Zhou, C, and Yang, H.-Y. 1999. *In vitro* delopment of early proembryos and plant regeneration via microculture in *Oryza sativa.* **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 55: 167-174.

Zhoa, J., Zhou, C, and Yang, H.-Y. 2000. Isolation and *in vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa L..* **Plant Cell Reports.** 19: 321-326.

Ziemienowicz, A., Tinland, B., Bryant, J., Gloeckler, V.,and Hohn, B. 2000. Plant enzymes but not *Agrobacterium* VirD2 mediated T-DNA ligation *in vitro.* **Molecular and Cellular Biology.** 20: 6317-6322.

Zupan, J.R., and Zambriski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology.** 107: 1041-1047.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

สูตรอาหาร N_6 (Nisch and Nisch, 1969)

สารประกอบ	Final concentration (มก./ล.)
KNO_3	950
NH_4NO_3	720
$MgSO_4.7H_2O$	185
$CaCl_2.2H_2O$	166
KH_2PO_4	68
$MnSO_4.4H_2O$	25
H_3BO_3	10
$ZnSO_4.7H_2O$	10
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
Inositol	100
Nicotinic acid	5.0
Thiamin.HCl	0.5
Pyridoxin.HCl	0.5
Glycine	5.0
Biotin	0.05
Sucrose	20000
Agar	8000

สารควบคุมการเจริญเติบโต	น้ำหนักโมเลกุล	1,000 µM	ตัวทำละลาย
2,4-Dichloroacetic acid(2,4-D)	221.7	0.0221 ก./ล.	เอทานอล 70%, 1N KOH
Naphthalenacetic acid (NAA)	186.21	0.0186 ก./ล.	1N KOH
Benzyladenine(BA)	225.26	0.0225 ก./ล	1N KOH

แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 2%

ชั่งแคลเซียมไฮโปคลอไรต์น้ำหนัก 3.34 ก. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ใช้

LB medium

Bacto tryptone	10 ก./ล.
Bacto-yeast extract	5 ก./ล.
NaCl	10 ก./ล.

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

สำหรับการเตรียมอาหารแข็งให้เติม bacto agar 18 ก./ล.

GUS assay buffer (1 มล.)

0.5M EDTA	20 μl
0.1M $K_3Fe(CN)_6$	5 μl
0.1M $K_4Fe(CN)_6$	5 μl
10% X-gluc in DMF	1 μl
0.2 M NaH_2PO_4	500 μl
dH_2O	469 μl

Carnoy's solution

เอทานอลสัมบูรณ์	300	มล.
คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)	150	มล.
Glacial acetic acid(CH_3COOH)	50	มล.

1N HCl

Glacial hydrochloric acid(HCl)	10 มล.
น้ำกลั่น	90 มล.

Aceto-orcein

ผงสี orcein	2.2	ก.
Glacial acetic acid(CH_3COOH)	100	มล.
น้ำกลั่น	55	มล.

เทผงสีใน glacial acetic acid แล้วนำไปอุ่นจนกระทั่งผงสีละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายที่กรองได้เป็น stock โดยเก็บในขวดสีชา เมื่อต้องการใช้ให้นำ stock สีปริมาตร 45 มล. มาเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล.

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมไฮเปอร์คลอไรด์ ($Ca(OCl_2)$) ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกกำจัดเชื้อผิวเมล็ดข้าว

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CHAINAT1	Between Groups	1838.972	11	167.179	42.684	.000
	Within Groups	94.000	24	3.917		
	Total	1932.972	35			
HOMSUPANBUREE	Between Groups	1870.667	11	170.061	36.660	.000
	Within Groups	111.333	24	4.639		
	Total	1982.000	35			

Post Hoc Tests

CHAINAT 1

Duncan

	N	Subset for alpha = .05						
condition		1	2	3	4	5	6	7
0.5%,15 min	3	9.66						
0.5%,30 min	3	11.66	11.66					
0.5%,45 min	3		13.33					
1%,15 min	3			18.66				
1%,30 min	3			20.00	20.00			
1%,45 min	3				23.33	23.33		
1.5%,15 min	3					23.66		
1.5%,30 min	3					24.00		
1.5%,45 min	3						27.66	
2%,15 min	3						29.33	29.33
2%,30 min	3						30.33	30.33
2%,45 min	3							32.00
Sig.		.228	.313	.417	.050	.701	.131	.131

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

HOMSUPANBUREE

Duncan

condition	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4	5
0.5%,15 min	3	14.0000				
0.5%,30 min	3	16.6667	16.6667			
0.5%,45 min	3		18.0000			
1%,15 min	3			24.6667		
1%,30 min	3			26.0000		
1%,45 min	3				29.6667	
1.5%,15 min	3				30.0000	
1.5%,30 min	3				30.6667	
1.5%,45 min	3				33.3333	33.3333
condition		1	2	3	4	5
2%,15 min	3					35.0000
2%,30 min	3					35.0000
2%,45 min	3					35.0000
Sig.		.142	.456	.456	.067	.396

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดแคลลัส

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Rate of induction of Chainat 1	Between Groups	3178.729	4	794.682	17.551	.000
	Within Groups	452.793	10	45.279		
	Total	3631.522	14			
Callus fresh weight Of Chainat 1	Between Groups	8.946E-03	4	2.237E-03	6.108	.009
	Within Groups	3.662E-03	10	3.662E-04		

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	Total	1.261E-02	14			
RATE OF INDUCTION OF HOMSUPANBUREE	Between Groups	3511.228	4	877.807	31.556	.000
	Within Groups	278.177	10	27.818		
	Total	3789.404	14			
CALLUS FRESH WEIGHT OF HOMSUPANBUREE	Between Groups	1.347E-03	4	3.367E-04	11.585	.001
	Within Groups	2.907E-04	10	2.907E-05		
	Total	1.638E-03	14			

Post Hoc Tests

Induction of Chainat 1

Duncan

	N	Subset for alpha = .05	
2,4-D concentration		1	2
4.50	3	54.4833	
13.50	3		86.7667
18.00	3		90.7667
9.00	3		91.8833
22.50	3		92.6667
Sig.		1.000	.340

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Fresh weight of Chainat 1

Duncan

2,4-D concentration	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
13.50	3	7.10000E-02		
9.00	3	8.00000E-02	8.00000E-02	
4.50	3	8.73333E-02	8.73333E-02	
22.50	3		.110000	.110000
18.00	3			.138900
Sig.		.342	.096	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Induction rate of Homsupanburee

Duncan

2,4-D conc	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
4.50	3	48.1833		
22.50	3		77.5667	
9.00	3		84.1667	84.1667
13.50	3		86.8000	86.8000
18.00	3			90.9167
Sig.		1.000	.067	.165

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Fresh weight of Homsupanburee

Duncan

2,4-D conc	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4
4.50	3	5.60000E-02			
18.00	3	6.26667E-02	6.26667E-02		
9.00	3		6.93333E-02	6.93333E-02	
13.50	3			7.63333E-02	7.63333E-02
22.50	3				8.26667E-02
Sig.		.161	.161	.143	.181

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ผลการทดลองที่ 3.3 การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และหอมสุพรรณบุรีให้เกิดต้นใหม่

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
REGENERATION RATE	Between Groups	4193.107	8	524.138	14.228	.000
	Within Groups	663.100	18	36.839		
	Total	4856.207	26			
NO. OF SHOOTS	Between Groups	215.380	8	26.923	16.357	.000
	Within Groups	29.627	18	1.646		
	Total	245.007	26			

REGENERATION RATE OF CHAINAT 1

Post Hoc Tests

Duncan

medium	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4	5
1	3	.000				
6	3		17.367			
2	3		22.900	22.900		
5	3			28.600	28.600	
7	3			28.733	28.733	
8	3			31.633	31.633	
3	3			32.133	32.133	
9	3				37.767	37.767
4	3					46.767
Sig.		1.000	.279	.109	.112	.086

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

NUMBER OF SHOOTS

Duncan

medium	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4	5
1	3	.000				
6	3		2.700			
8	3		4.300			
7	3		4.667			
5	3		4.900	4.900		
2	3		5.033	5.033		
3	3			7.167	7.167	
9	3				8.833	8.833
4	3					9.700
Sig.		1.000	.059	.054	.129	.419

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1= no growth regulator　　2= NAA 2.5 μM +BA 4.5 μM

3= NAA 2.5 μM +BA 9 μM　　4= NAA 2.5 μM +BA 13.5 μM

5= NAA 2.5 µM +BA 18 µM
6= NAA 5 µM +BA 4.5 µM
7= NAA 5 µM +BA 9 µM
8= NAA 5 µM +BA 13.5 µM
9= NAA 5 µM + BA 18 µM

Regeneration of Homsupanburee

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
RATE	Between Groups	4804.871	4	1201.218	131.443	.000
	Within Groups	91.387	10	9.139		
	Total	4896.257	14			
SHOOT	Between Groups	110.793	4	27.698	19.956	.000
	Within Groups	13.880	10	1.388		
	Total	124.673	14			

REGENERATION RATE

Duncan

	N	Subset for alpha = .05				
VAR00001		1	2	3	4	5
1	3	.0000				
2	3		22.2000			
3	3			32.0000		
4	3				39.7667	
5	3					53.3000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

NUMBER OF SHOOTS

Duncan

Medium	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	3	.000		
2	3		5.233	
3	3		6.000	6.000
4	3		6.833	6.833
5	3			7.767
Sig.		1.000	.143	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1= no growth regulator

2= NAA 2.5 μM +BA 4.5 μM

3= NAA 2.5 μM +BA 9 μM

4= NAA 2.5 μM +BA 13.5 μM

5= NAA 2.5 μM +BA 18 μM

<u>**ผลการทดลองที่ 3.4**</u> การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินและซีโฟแทคซีมต่อแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการเกิดต้นใหม่

KANAMYCIN

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regeneration rate	Between Groups	7120.003	5	1424.001	623.498	.000
	Within Groups	27.407	12	2.284		
	Total	7147.409	17			
No. of shoots	Between Groups	245.025	5	49.005	141.361	.000
	Within Groups	4.160	12	.347		
	Total	249.185	17			

Post Hoc Tests

REGENERATION RATE

Duncan

Kanmycin concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2
50.00	3	.0000	
100.00	3	.0000	
150.00	3	.0000	
200.00	3	.0000	
250.00	3	.0000	
.00	3		53.3667
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

NUMBER OF SHOOTS

Duncan

Kanmycin concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2
50.00	3	.0000	
100.00	3	.0000	
150.00	3	.0000	
200.00	3	.0000	
250.00	3	.0000	
.00	3		9.9000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

CEFOTAXIME

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regeneration rate	Between Groups	6997.518	7	999.645	47.798	.000
	Within Groups	334.620	16	20.914		
	Total	7332.138	23			
No. of shoots	Between Groups	158.347	7	22.621	20.865	.000
	Within Groups	17.347	16	1.084		
	Total	175.693	23			

REGENERATION RATE

Duncan

Cefotaxime concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4
350.00	3	12.133			
300.00	3	14.267			
250.00	3	17.633			
200.00	3		37.533		
150.00	3		45.100	45.100	

Cefotaxime concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4
100.00	3			50.000	50.000
50.00	3			53.033	53.033
.00	3				55.567
Sig.		.181	.060	.060	.176

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

NUMBER OF SHOOTS

Duncan

Cefotaximen concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4
350.00	3	1.333			
300.00	3	2.533			
250.00	3	3.100	3.100		
200.00	3		4.633	4.633	
100.00	3		4.900	4.900	
150.00	3			5.300	
50.00	3				8.667
.00	3				9.000
Sig.		.065	.061	.469	.700

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ผลการทดลองที่ 4.1 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทคซีมและคาบินิซินลินต่อการเจริญของ *A. tumefaciens*

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Carbinicillin VS LBA4404	Between Groups	148.543	7	21.220	1950.550	.000
	Within Groups	.174	16	1.088E-02		
	Total	148.717	23			
Cefotaxime VS EHA105	Between Groups	184.873	7	26.410	1280.508	.000
	Within Groups	.330	16	2.063E-02		
	Total	185.203	23			
Carbinicillin VS LBA4404	Between Groups	124.490	7	17.784	1080.564	.000

	Within Groups	.263	16	1.646E-02		
	Total	124.753	23			
Cefotaxime VS EHA105	Between Groups	151.368	7	21.624	1186.233	.000
	Within Groups	.292	16	1.823E-02		
	Total	151.660	23			

Post Hoc Tests

Carbinicillin/ *A. tumefaciens* LBA4404

Duncan

	N	**Subset for alpha = .05**							
CONC		1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	.0000							
50	3		3.1000						
100	3			4.1667					
150	3				4.4667				
200	3					6.1233			
250	3						6.6000		
300	3							7.2833	
400	3								8.3000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

cefotaxime/ *A. tumefaciens* LBA4404

Duncan

CONC	N	Subset for alpha = .05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	.0000							
50	3		5.0000						
100	3			6.1167					
150	3				6.5333				
200	3					6.9667			
250	3						7.4833		
300	3							9.0667	
400	3								9.5667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

carbiniillin/ *A. tumefaciens* EHA105

Duncan

CONC	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	.0000						
50	3		3.1333					
100	3			4.0833				
150	3			4.1333				
200	3				5.2167			
250	3					6.0667		
300	3						7.1500	
400	3							7.5500
Sig.		1.000	1.000	.640	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

cefotaxime/ *A. tumefaciens* EHA105

Duncan

CONC	N	Subset for alpha = .05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	.0000							
50	3		4.9667						
100	3			5.3667					
150	3				6.3167				
200	3					6.6833			
250	3						7.1667		
300	3							8.1333	
400	3								8.5667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

<u>ผลการทดลองที่ 4.4</u> การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regeneration rate	Between Groups	44000.000	5	8800.000	264.000	.000
	Within Groups	600.000	18	33.333		
	Total	44600.000	23			
Root fresh weight	Between Groups	.109	5	2.186E-02	422.419	.000
	Within Groups	9.316E-04	18	5.175E-05		
	Total	.110	23			
Shoot fresh weight	Between Groups	.512	5	.102	34.805	.000
	Within Groups	5.299E-02	18	2.944E-03		
	Total	.565	23			

Post Hoc Tests

Regeneration rate

Duncan

Kanamycin concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4
200.00	4	.0000			
250.00	4	.0000			
150.00	4	5.0000			
100.00	4		15.0000		
50.00	4			90.0000	
.00	4				100.0000
Sig.		.261	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Root fresh weight

Duncan

Kanamycin concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2	3	4
200.00	4	.000000			
250.00	4	.000000			
150.00	4	1.95000E-03			
100.00	4		1.73750E-02		
50.00	4			6.68500E-02	
.00	4				.187075
Sig.		.722	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Shoot fresh weight

Duncan

Kanamycin concentration	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
200.00	4	.000000		
250.00	4	.000000		
150.00	4	2.01250E-02		
100.00	4	5.79750E-02		
50.00	4		.268500	
.00	4			.371800
Sig.		.182	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

การทดลองที่ 5.2 การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regeneration rate	Between Groups	36854.547	5	7370.909	140.196	.000
	Within Groups	1261.814	24	52.576		
	Total	38116.361	29			
Root fresh weight	Between Groups	.146	5	2.917E-02	16.105	.000
	Within Groups	4.346E-02	24	1.811E-03		
	Total	.189	29			
Shoot fresh weight	Between Groups	.423	5	8.461E-02	44.573	.000
	Within Groups	4.556E-02	24	1.898E-03		
	Total	.469	29			

Regeneration rate

Duncan

Hygromycin concentration	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
20	5	.0000				
25	5	.0000				
15	5		10.6680			
10	5			40.0400		
5	5				60.0200	
0	5					95.6600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Root fresh weight

Duncan

Hygromycin concentration	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
20	5	.000000		
25	5	.000000		
15	5	5.17600E-02		
10	5		.108140	
5	5		.156760	.156760
0	5			.174360
Sig.		.080	.083	.519

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Shoot fresh weight

Duncan

Hygromycin concentration	N	Subset for alpha = .05 1	2	3
20	5	.000000		
25	5	.000000		
15	5	2.37600E-02		
10	5		.164180	
5	5			.266920
0	5			.271720
Sig.		.424	1.000	.863

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

การทดลองที่ 5.4 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ กข6 ปกติและข้าวพันธุ์ กข6 แปลงพันธุ์

ChlorophyllA, B, Total chlorophyll, A/B

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
chlorophyll A	Between Groups	.110	5	2.205E-02	.979	.469
	Within Groups	.270	12	2.253E-02		
	Total	.381	17			
chlorophyll B	Between Groups	1.184	5	.237	2.938	.059
	Within Groups	.967	12	8.060E-02		
	Total	2.151	17			
TOTAL chlorophyll	Between Groups	1.823	5	.365	2.455	.094
	Within Groups	1.782	12	.149		
	Total	3.605	17			

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
chlorophyll A /B	Between Groups	5.860E-02	5	1.172E-02	5.941	.065
	Within Groups	2.367E-02	12	1.973E-03		
	Total	8.227E-02	17			

Osmotic Potential of T_2

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 month	Between Groups	4.982E-04	5	9.963E-05	.697	.636
	Within Groups	1.716E-03	12	1.430E-04		
	Total	2.214E-03	17			

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
2 months	Between Groups	3.165E-03	5	6.329E-04	1.211	.362
	Within Groups	6.272E-03	12	5.227E-04		
	Total	9.437E-03	17			

Seed of T_0 plants

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WIDTH	Between Groups	1.467E-03	5	2.933E-04	.433	.817
	Within Groups	8.133E-03	12	6.778E-04		
	Total	9.600E-03	17			
LENGTH	Between Groups	5.783E-03	5	1.157E-03	1.113	.404

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	Within Groups	1.247E-02	12	1.039E-03		
	Total	1.825E-02	17			
RATIO	Between Groups	2.393E-03	5	4.787E-04	.251	.932
	Within Groups	2.293E-02	12	1.911E-03		
	Total	2.532E-02	17			

Seed of T_1 plant

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WIDTH	Between Groups	8.856E-02	5	1.771E-02	.923	.499
	Within Groups	.230	12	1.919E-02		
	Total	.319	17			
LENGTH	Between Groups	5.111E-03	5	1.022E-03	.396	.843

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	Within Groups	3.100E-02	12	2.583E-03		
	Total	3.611E-02	17			
RATIO	Between Groups	2.799E-03	5	5.598E-04	.160	.973
	Within Groups	4.204E-02	12	3.503E-03		
	Total	4.484E-02	17			

Panicle of To

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
No. of 1^{o}BRANCH	Between Groups	2.444	5	.489	2.933	.059
	Within Groups	2.000	12	.167		
	Total	4.444	17			
No. of SEED	Between Groups	449.778	5	89.956	.713	.626
	Within Groups	1514.667	12	126.222		
	Total	1964.444	17			
LENGTH	Between Groups	68.778	5	13.756	1.777	.192
	Within Groups	92.880	12	7.740		
	Total	161.658	17			

Panicle of T_1

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
No. of 1^{o}BRANCH	Between Groups	1.333	5	.267	.686	.643
	Within Groups	4.667	12	.389		
	Total	6.000	17			
No. of SEED	Between Groups	687.833	5	137.567	.367	.862
	Within Groups	4500.667	12	375.056		
	Total	5188.500	17			
LENGTH	Between Groups	27.687	5	5.537	1.025	.446
	Within Groups	64.828	12	5.402		
	Total	92.516	17			

T_0 **height and flag leaf**

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
height	Between Groups	48.447	4	12.112	.519	.724
	Within Groups	233.567	10	23.357		
	Total	282.013	14			
length	Between Groups	69.489	4	17.372	2.044	.164
	Within Groups	84.987	10	8.499		
	Total	154.476	14			
wide	Between Groups	10.124	4	2.531	.665	.630
	Within Groups	38.053	10	3.805		
	Total	48.177	14			
length/wide ratio	Between Groups	.331	4	8.280E-02	3.797	.050
	Within Groups	.218	10	2.181E-02		
	Total	.549	14			

T_1 **height and flag leaf**

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
height	Between Groups	335.111	5	67.022	1.569	.242
	Within Groups	512.667	12	42.722		
	Total	847.778	17			
length	Between Groups	27.125	5	5.425	.356	.869

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	Within Groups	182.780	12	15.232		
	Total	209.905	17			
wide	Between Groups	22.053	5	4.411	1.429	.283
	Within Groups	37.047	12	3.087		
	Total	59.100	17			
length/wide ratio	Between Groups	9.066E-02	5	1.813E-02	.424	.823
	Within Groups	.513	12	4.273E-02		
	Total	.603	17			

ประวัติผู้เขียน

นางสาวทศพร พิพัฒน์ภานุกูล เกิดเมื่อวันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2515 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อ พ.ศ. 2537 ระหว่างปี พ.ศ. 2538-2541 ศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และปี พ.ศ. 2542-2546 ศึกษาต่อในหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบันทำงานที่คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครปฐม จ. นครปฐม