



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ต่างๆที่ปลูกทางภาคเหนือ
และการถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย
Studies on callus culture of glutinous Thai rice varieties in the North of Thailand
and *Agrobacterium*-mediated transformation of the glutinous rice

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2547

จำนวน 300,000 บาท

และประจำปี 2548

จำนวน 265,200 บาท

หัวหน้าโครงการ

ดร. ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

ผู้ร่วมโครงการ

1. ผศ.ดร. นลินี รุ่งเรืองศรี
2. ผศ.ดร. อุทัย รุ่งเรืองศรี
3. ผศ.ดร. วราภรณ์ แสงทอง
4. ผศ.ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30/9/2549

การศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกทาง
ภาคเหนือ และการถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียว
โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

STUDIES ON CALLUS CULTURE OF GLUTINOUS THAI RICE
VARIETIES IN THE NORTH OF THAILAND AND AGROBACTERIUM-
MEDIATED TRANSFORMATION OF THE GLUTINOUS RICE

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์¹ นลินี รุ่งเรืองศรี¹ อุทัย รุ่งเรืองศรี² วราภรณ์ แสงทอง¹
และแสงทอง พงษ์เจริญกิต¹

CHOTIPA SAKULSINGHAROJ¹, NALINEE ROONGRUANGSREE¹, UTHAI
ROONGRUANGSREE², VARAPORN SANGTONG¹
AND SAENGTONG PONGJAROENKIT¹

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

เทคนิคพันธุวิศวกรรมสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการถ่ายยีนในข้าว การศึกษาการถ่ายยีนในข้าวจำเป็นที่จะต้องมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงแคลลัส และการชักนำให้เกิดต้นที่เหมาะสม เพื่อให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวหลายสายพันธุ์และการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย การทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของไพรลีนและ 2,4-D ต่างๆ กัน พบว่าข้าวเหนียวเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อใช้ไพรลีนความเข้มข้น 1.44 หรือ 2.88 ก./ล. ส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมคือ 2 หรือ 4 มก./ล. เมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA และไคเนติน พบว่าแคลลัสของข้าวเหนียวส่วนใหญ่ที่ใช้ทดลองสามารถเจริญเป็นต้นได้ ยกเว้นข้าวเหนียวแพร่ และกข 10

การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง โดยศึกษาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัส พบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ได้

ศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวเหนียวโดยเชื้อโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 ที่มี binary vector pCAMBIA1303 ซึ่งมียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายโกรแบคทีเรีย คือ 15 นาที โดยให้ แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซิน มีการแสดงออกของยีน *gusA* และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ จากการวิเคราะห์ต้นข้าวในระดับโมเลกุล ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าว และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า มีการแทรกของยีนในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียว กข 6 พบว่าไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 15 มก./ล. เหมาะสมที่จะใช้คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน เมื่อทำการศึกษาการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 (pCAMBIA 1303) พบว่ามีแคลลัสประมาณ 24.24 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาไฮโกรมัยซินเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ และแคลลัสที่ด้านทานตอยาไฮโกรมัยซินมีการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ β - glucuronidase เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสและต้นข้าวที่ด้านทานตอยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII* พบว่ามียีนแทรกอยู่ในจีโนมของข้าว แสดงว่าสามารถถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างต้นข้าวเหนียวสันป่าตอง และ กข 6 ดัดแปลงพันธุกรรม และได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมโดยถ่ายยีนที่สำคัญและพัฒนาให้ข้าวเหนียวมีผลผลิตสูงและมีคุณภาพที่ดีตามต้องการในอนาคตได้

ABSTRACT

Genetic engineering can be used to improve rice varieties by gene transfer techniques. Transformation of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) requires suitable conditions for callus culture and plant regeneration for high transformation efficiency. In this study, callus culture of several Thai glutinous rice varieties and *Agrobacterium*-mediated transformation were investigated. Mature rice seeds were cultured on N6D medium containing different combinations of proline and 2,4-D concentrations. The results showed that all varieties studied produced high percentage of callus formation at 1.44 or 2.88 g/l proline and 2 or 4 mg/l 2,4-D. The calli were regenerated on MS medium containing NAA and kinetin. It was found that all varieties except Phare and RD 10 were able to be regenerated into plantlets.

Agrobacterium-mediated gene transfer for glutinous rice cv. Niaw Sanpahtawng were performed. The effects of certain factors on rice transformation were studied to

improve transformation efficiency. It was found that the antibiotic hygromycin concentration for selection of transformed Niaw Sanpahtawng calli was 50 mg/l which inhibited growth of untransformed calli about 92%. *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 harboring binary vector pCAMBIA1303 containing genes for hygromycin resistance (*hptII*) and β -glucuronidase (*gusA*) were used for transformation. The infection time of 15 min produced the highest percentage (54.37%) of hygromycin-resistant calli. The calli showed the expression of *gusA* gene and were developed to rice plants. PCR analysis of leaf genomic DNA from transformed plants was conducted using primers specific to *gusA* and *hptII* genes. The result indicated that the *hptII* and *gusA* genes were integrated into the rice genome. The first transgenic Niaw Sanpahtawng was normally grown in the greenhouse.

Transformation of rice cv. RD 6 was studied. Hygromycin concentration at 15 mg/l was suitable for selection of transformed calli. Transformation of RD 6 by *Agrobacterium tumefaciens* were performed using *Agrobacterium* strain AGL1 (pCAMBIA 1303). We found that 24.24 percentage of calli surviving on media supplemented with hygromycin. Hygromycin-resistant calli were GUS positive. PCR analysis of genomic DNA from hygromycin-resistant calli and plants using primers specific to *hptII* gene indicated the stable integration of genes in transformed calli and rice plants.

Overall, the transgenic glutinous rice plants varieties, Niaw Sanpahtawng and RD 6, were developed. This research provided the promising results for future improvement of Thai rice varieties with increased yields and quality by genetic engineering.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2547–2548 ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับการเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำแนะนำเป็นอย่างดี และให้ความอนุเคราะห์เชื้ออโกรแบคทีเรีย และ binary vector และขอขอบพระคุณ รศ.ประวีตร พุทธานนท์ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวสำหรับการทำวิจัย และคุณสกุล มูลคำ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการปลูกข้าวและการเพาะเมล็ดข้าว

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกข้าว

นอกจากนี้ขอขอบคุณนายบรรณศักดิ์ เชื้อทอง และนางสาวณิชนัน ธรรมรักษ์ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการช่วยจัดรูปเล่มรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ให้เสร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2549

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลการทดลองและวิจารณ์	23
สรุปผลการทดลอง	72
เอกสารอ้างอิง	73

สารบัญตาราง

			หน้า
ตารางที่	1	ข้อมูลผลผลิตเฉลี่ยในการปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ในประเทศไทย	9
	2	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D	23
	3	ผลของ 2,4-D และ โพรลีน ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง	26
	4	สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6	28
	5	ปริมาณโพรลีนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ในสภาวะที่มีแสง	30
	6	การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เลี้ยงบนอาหาร N6D ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ	34
	7	การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล.และมีโพรลีนความเข้มข้นระดับต่าง ๆ	36
	8	อิทธิพลของ NAA และ Kinetin ต่อประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้น	39
	9	ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ซึ่งเติม IAA และ BA ในปริมาณต่าง ๆ กัน	40
	10	ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เลี้ยงบนอาหาร N6 และ MS ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน	42
	11	ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ตึ่งน้ำออกบางส่วนแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร N6, MS และ DKN ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน	43
	12	อิทธิพลของ NAA และ kinetin ต่อการชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	49
	13	อิทธิพลของ NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ต่อการชักนำให้แคลลัสเกิดต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	52
	14	ความเข้มข้นของยาไฮโกรมัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง	56
	15	อิทธิพลของระยะเวลาการแช่แคลลัสร่วมกับสารละลาย <i>Agrobacterium</i> (infection time) ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (ดัดแปลงจาก Toki, 1997)	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า	
ตารางที่	16	อิทธิพลของ acetosyringone ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกประมาณ 14 วัน	61
	17	อิทธิพลของระยะเวลาการแช่แคลลัสร่วมกับสารละลาย <i>Agrobacterium</i> (infection time) ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (ดัดแปลงจาก Pipatpanukul <i>et.al.</i> , 2004)	63
	18	ปริมาณยาไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่ได้รับยีน	67
	19	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย	68

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างของต้นข้าว	4
2	ส่วนประกอบของรวงข้าว	5
3	โครงสร้างของเมล็ดข้าว	6
4	เมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6	8
5	ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6	9
6	เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์อื่น ๆ	10
7	โครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง	15
8	ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์	24
9	ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล และ โพรลีน 2.88 ก./ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์	27
10	เปรียบเทียบการเกิดแคลลัสในแต่ละสภาวะการทดลอง	29
11	แสดงลักษณะแคลลัสในแต่ละทรีตเมนต์	29
12	เปรียบเทียบการเกิดแคลลัสที่ระดับโพรลีนต่าง ๆ	31
13	ลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับโพรลีนระดับต่าง ๆ กัน	31
14	การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
15	ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์	35
16	การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของโพรลีนต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์	36
17	ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีโพรลีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์	37
18	แคลลัสของข้าวเหนียวดำเกิดจุดสีม่วงและเขียว และกำลังพัฒนาเป็นต้น	38
19	ต้นข้าวเหนียวที่พัฒนามาจากแคลลัสของพันธุ์ต่าง ๆ	38
20	แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้น	39
21	ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ซึ่งมีการเติมฮอร์โมน IAA ร่วมกับ BA ในปริมาณต่าง ๆ กัน เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้น	41
22	เปรียบเทียบการเกิดพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 และ MS ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน	42
23	ลักษณะแคลลัสที่ผ่านการดึ่งน้ำออกบางส่วน เป็นเวลานาน 5 วัน	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 24 เปรียบเทียบการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่ดิ่งน้ำออกบางส่วนแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 , MS และ DKN ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน	44
25 แคลลัสที่ดิ่งน้ำออกบางส่วนแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 , MS และ DKN ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน	45
26 การชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6	47
27 ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณ NAA และ kinetin ระดับต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	50
28 ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์	51
29 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล.	51
30 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	53
31 ลักษณะแคลลัสที่กำลังพัฒนาเป็นยอดและต้นอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน	53
32 ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล.	54
33 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 10 ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	55
34 ลักษณะแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่างๆ กัน	57
35 การถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง	58
36 การถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง	59
37 แคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน <i>gus</i> เมื่อใช้ acetosyringone 50 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีน	60
38 แคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. เป็นเวลา 14 วันเมื่อใช้ acetosyringone 50 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีน	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 39	แคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน <i>gus</i> เมื่อใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีน	61
40	ลักษณะแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของ ยีน <i>gus</i> เมื่อใช้ acetosyringone ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในการถ่ายยีน	62
41	แคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. เป็นเวลา 14 วันเมื่อใช้ acetosyringone ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการถ่ายยีน	62
42	ลักษณะของแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากผ่านการถ่ายยีนที่ใช้ช่วงเวลาในการแช่แคลลัสต่างๆ กัน	64
43	แคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงร่วม 3 วัน มีการแสดงออกของยีน <i>gus</i>	64
44	การพัฒนาเป็นต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม	65
45	ผลการตรวจสอบยีน <i>gusA</i> และ <i>hptII</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์	66
46	ลักษณะของต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม	66
47	การเจริญของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกหลังการถ่ายยีนที่ระยะเวลาต่าง ๆ	68
48	การตรวจสอบการได้รับยีนด้วยวิธี GUS Assay	69
49	ลักษณะแคลลัสที่เกิดสารสีฟ้าภายหลังการทดสอบด้วยวิธี GUS Assay	69
50	การทดสอบใบของต้นข้าวที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน	70
51	การตรวจสอบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>hptII</i>	71

คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่เป็นอาหารที่สำคัญของประชากรโลก ในปัจจุบันมากกว่า 50% ของประชากรโลกหรือประมาณ 3,000 ล้านคนซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารประจำวัน (สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร) องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) คาดว่าประชากรโลกจะเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 7,000 ล้านคนในอีก 10 ปีข้างหน้า (พ.ศ. 2553) ประชากรที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทวีปเอเชีย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มผลผลิตข้าวให้พอเพียงกับประชากรที่กำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สำหรับประเทศไทยข้าวนอกจากจะเป็นอาหารหลักแล้วยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ข้าวเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญนำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมากทุกปี การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิต และให้ได้เมล็ดที่มีคุณภาพดีจึงมีความสำคัญต่อประเทศไทยเป็นอย่างมาก

ทางภาคเหนือของประเทศไทยมีการปลูกข้าวเหนียวเป็นหลัก พื้นที่ปลูกข้าวนาสวนในภาคเหนือตอนบนใช้ปลูกข้าวเหนียวประมาณร้อยละ 80 (พันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร) พันธุ์ข้าวเหนียวที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุด คือ กข6 คิดเป็น 58% ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด หรือ 73% ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว พันธุ์ข้าวเหนียวที่ปลูกรองลงมาคือ กข10 และพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ เหนียวสันป่าตอง กข8 เหนียวแพร่1 และพันธุ์พื้นเมือง

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในหลายๆด้าน การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นวิธีการหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการถ่ายยีนในพืชเพื่อให้เกิดพืชพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์เช่นมีผลผลิตสูงขึ้น มีความต้านโรคและแมลงศัตรูพืช มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น เป็นต้น ความสำเร็จในการถ่ายยีนขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ การชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดี ประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้น รวมถึงสภาวะในการถ่ายยีน

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสในข้าวเหนียวซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์หลักที่ปลูกทางภาคเหนือ รวมทั้งศึกษาและพัฒนาการถ่ายยีนในข้าวเหนียวโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นและสะดวกรวดเร็ว เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวไทยในอนาคต

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดข้าวเหนียว การเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธีการใช้อโกรแบคทีเรียในข้าวไทย และเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการถ่ายยีนอื่นๆที่เป็นประโยชน์ในด้านเศรษฐกิจและโภชนาการ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ

ตรวจเอกสาร

ความสำคัญของข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชีย โดยเฉพาะประเทศไทย ข้าวเป็นอาหารหลักและสินค้าส่งออกที่สำคัญ ซึ่งข้าวจากประเทศไทยได้รับความนิยมจากผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศเป็นอย่างมาก ประเทศไทยนับเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ ที่มีการผลิตข้าวโดยรวมคิดเป็น 25.763 ล้านตัน ข้าวเปลือก โดยแบ่งเป็นข้าวนาปี 19.997 ล้านตันข้าวเปลือก และข้าวนาปรัง 5.766 ล้านตัน ข้าวเปลือกซึ่งมีการส่งออกในรูปของข้าวสาร คิดเป็นมูลค่าประมาณ 6 – 8 หมื่นล้านบาท (อรอนงค์, 2547)

การเพาะปลูกข้าวในโลก คิดเป็นร้อยละ 48 ของพื้นที่เพาะปลูกของโลก โดยมีแหล่งผลิตข้าวหลัก คือ ประเทศจีน และอินเดีย ส่วนประเทศไทยมีพื้นที่การเพาะปลูกเป็นอันดับ 6 รองจากประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ และเวียดนาม ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จำนวนมาก ได้ให้ความสนใจในการศึกษา และพัฒนาพันธุ์ข้าว เช่น โครงการวิจัยจีโนมข้าวนานาชาติ ซึ่งนำโดยประเทศญี่ปุ่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยกลุ่มบริษัทเอกชน เช่น บริษัทมอนซานโต้ และบริษัทซินเจนต้า เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาและพัฒนาในด้านการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากข้าวในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย (มรกต และศิริพร, 2547)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวในต่างประเทศได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และเป็นที่แพร่หลาย ในขณะเดียวกันการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับข้าวภายในประเทศไทย ก็กำลังได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากข้าวมีจีโนมขนาดเล็ก มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง และมีระบบการถ่ายยีนที่ได้รับการพัฒนาแล้ว (อภิชาติ, 2544) ในปัจจุบันหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว สามารถค้นพบยีนในข้าวที่เป็นประโยชน์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านทานต่าง ๆ ยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการทนต่อน้ำท่วม และคุณสมบัติความหอม เป็นต้น โดยความรู้เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สำคัญได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาและศึกษาในระดับโมเลกุลของธัญพืชอื่น ๆ ได้ (มรกต และศิริพร, 2547)

ชีววิทยาของข้าว

ข้าว เป็นธัญพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในกลุ่มของพืชตระกูลหญ้า (Family Gramineae) สกุลออไรซา (*Oryza*) ซึ่งข้าวที่ปลูกเพื่อบริโภคมี 2 ชนิด คือ ข้าวเอเชีย หรือ (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) ข้าวจัดเป็นพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก ประมาณ 4.3 ล้านเบส มีโครโมโซม 12 คู่ ($2n = 24$) ซึ่งจัดได้ว่ามีขนาดเล็กกว่าข้าวโพดและข้าวสาลี 16 และ 40 เท่า ตามลำดับ (อภิชาติ, 2540; Shimamoto, 1995)

การเกิดวิวัฒนาการของข้าวทำให้เกิดการพัฒนาพันธุ์ใหม่ เพื่อปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศวิทยาที่ขึ้นอยู่ และมีผลทำให้มีการปรับเปลี่ยนของรูปพรรณสัณฐานและสรีรวิทยา โดยสามารถจัดแบ่งข้าวออกได้ เป็น 3 subspecies ด้วยกัน (สุรางค์ศรี, 2537) ได้แก่

1. **subspecies Indica** ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ขึ้นแพร่กระจายและปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศของเขตร้อนและร้อนชื้นแถบเอเชียใต้ เช่น ประเทศอินเดีย ศรีลังกา และแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ประเทศพม่า ไทย สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม ฟิลิปปินส์ และบางส่วนของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เป็นต้น ต่อมาถูกนำไปปลูกในทวีปอเมริกาด้วย

ข้าวอินดิกาสามารถปรับตัวได้ดีในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และทนต่อความแห้งแล้ง แต่ไม่ทนต่อสภาพอากาศที่หนาวเย็น พันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่มีคุณลักษณะที่ดีของความต้านทานต่อการระบาดของโรค แมลง และแข่งขันกับวัชพืชได้ดี มีลักษณะเด่น คือ ต้นสูง หักล้มง่าย แตกกอมาก ใบยาวโค้งงอ สีเขียวอ่อน ไวต่อการตอบสนองต่อช่วงแสง อายุสุกแก่ช้า ตอบสนองต่อระดับปุ๋ยต่ำ เมล็ดยาว มีปริมาณแป้งอะมิโลสสูงประมาณ 23 - 31%

2. **subspecies Japonica** เป็นพันธุ์ข้าวที่มีการแพร่กระจายเพาะปลูกทั่วไปในเขตอบอุ่น และเขตหนาว เช่น ประเทศญี่ปุ่น เกาหลี สาธารณรัฐประชาชนจีน และไต้หวัน เป็นต้น

ข้าวชนิดนี้สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพอากาศที่หนาวเย็น แต่ไม่ต้านทานต่อความแห้งแล้ง มีลักษณะเด่นคือ ลำต้นเตี้ยแข็งแรง แตกกอปานกลาง ใบสั้น สีเขียวเข้ม ไวต่อการตอบสนองต่อช่วงแสง อายุแก่เร็ว เมล็ดกลม มีปริมาณแป้งอะมิโลสต่ำประมาณ 10 - 24% ตอบสนองต่อระดับปุ๋ยสูงได้ดี และต้านทานต่อการหักล้มจึงทำให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ข้าวชนิดอินดิกามาก

3. **subspecies Javanica หรือ Bulu หรือ Gundil** ซึ่ง subspecies นี้มีเพาะปลูกแพร่หลายเฉพาะในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น แต่สามารถพบได้ในบางส่วนของฟิลิปปินส์ และพื้นที่บนภูเขาในแถบมาดากัสการ์ (<http://www.irri.org/about/faq.asp>)

ข้าวชนิดนี้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศของเขตร้อน และร้อนชื้นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (<http://pas.byu.edu/AgHrt100/rice.htm>) มีฐานวิวัฒนาการคล้ายข้าว *japonica* แต่มีใบที่กว้าง และมีขนมากกว่าข้าว *japonica* เมล็ดยาวปานกลาง ตรงปลายมีขน มีปริมาณแป้งอะมิโลสปานกลาง (<http://www.irri.org/about/faq.asp>)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว (ศิริพร, 2527)

ราก (roots)

รากของต้นข้าวเป็นระบบรากฝอย มีความยาวประมาณ 30 - 40 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร ตลอดความยาวของราก เมื่อเมล็ดงอกรากชุดแรกเรียกว่ารากชั่วคราว (primary หรือ seminal root) ต่อมาจะมีรากแขนง (lateral roots) ขึ้น ๆ

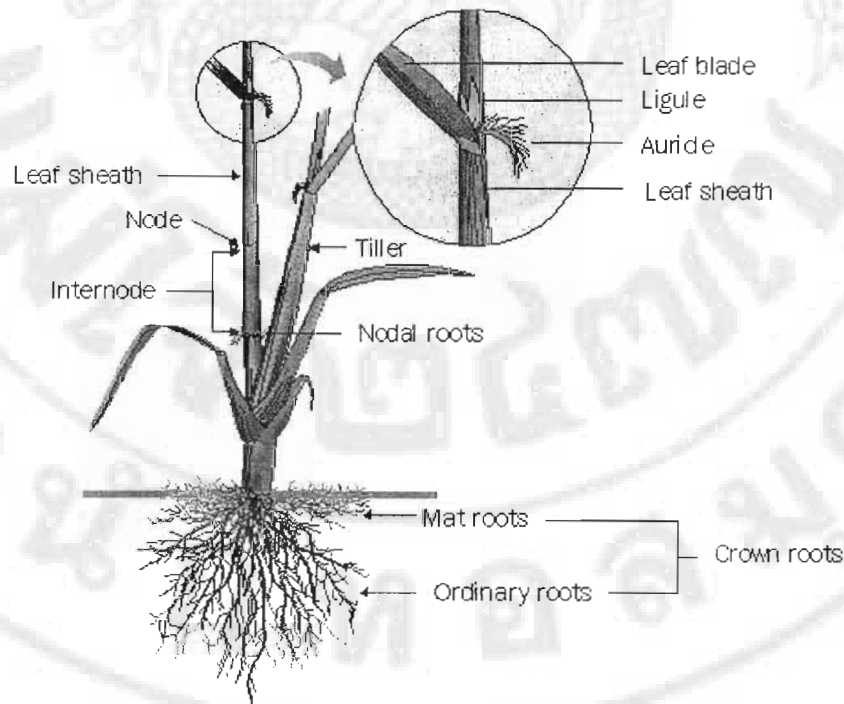
เมื่อมีกล้ามมีข้อแล้ว รากชุดแรก และรากแขนงจะหายไปแล้วเกิดรากชุดใหม่ขึ้นมาแทนบริเวณข้อ ใต้ดิน เรียกว่า crown roots หรือ adventitious roots (ภาพที่ 1)

ลำต้น (culms)

ลำต้นมีความสูงประมาณ 35 – 150 เซนติเมตร แต่อาจมีความยาวถึง 5 เมตร ในลำ ต้นของข้าวขึ้นน้ำชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะมี ความสูงมากเมื่อกำลังออกดอก ลำต้นของข้าว ประกอบด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) ปล้องที่อยู่ทางโคนต้นจะสั้นกว่าแต่มีขนาด ใหญ่กว่าปล้องที่อยู่ส่วนปลายของลำต้น ตรงข้อของลำต้นจะเป็นส่วนที่พองออกมาเรียกว่า pulvinus ซึ่งอาจมีสีม่วงอ่อนถึงม่วงแก่ โดยลำต้นจะอยู่รวมกันเป็นกอข้าวซึ่งประกอบด้วยลำ ต้นหลัก (main axis) และแขนง (tiller) ตาที่อยู่ข้อล่าง (crown node) จะเจริญเป็นแขนงหรือ หน่อ โดยหน่อหรือข้าวที่แตกออกมาใหม่จะออกมาจากต้นเดิม และมักจะมีหน่อหรือต้นข้าวที่ แตกออกมาอีกเป็นครั้งที่สองหรือสามเสมอ (ภาพที่ 1)

ใบ (leaves)

ใบข้าวเกิดมาจากข้อทุกข้อของลำต้น ใบข้าวมีลักษณะเหมือนใบพืชตระกูลหญ้าอื่น ๆ คือประกอบด้วยกาบใบ (leaf sheath) แผ่นใบ (leaf blade) เยื่อกั้นน้ำฝน (ligule) และเขี้ยวใบ (auricle) ใบข้าวบนที่สุดได้รวงข้าวที่แก่แล้วเรียกว่าใบธง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของต้นข้าว

ที่มา : <http://www.riceweb.org/Plant.htm#morph>

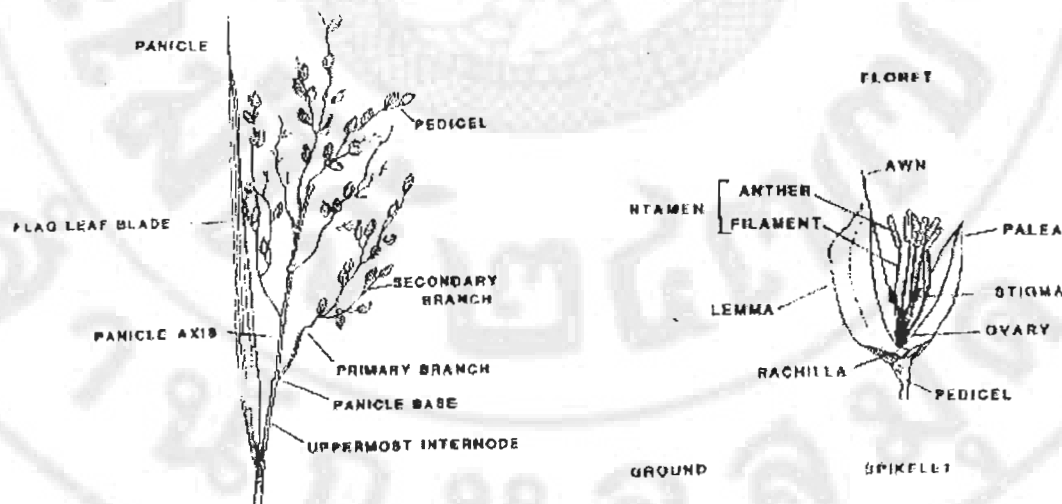
ช่อดอก หรือรวงข้าว (inflorescence)

ข้าวมีช่อดอกแบบ panicle ที่ปลายยอด มีความยาวประมาณ 14 – 42 เซนติเมตร แต่ละช่อดอกประกอบด้วยดอกแบบ spikelet ตั้งแต่ 50 – 500 ดอก แต่โดยปกติแล้วมีประมาณ 100 ดอก แกนกลางของช่อดอกเรียกว่า rachis (ภาพที่ 2)

ดอก (spikelet)

ดอกเกิดบนก้านชู pedicel ดอกหนึ่งมี 3 ดอกย่อย(floret) ซึ่งสองดอกจะไม่เจริญกลายเป็น เลมมา (sterile lemma) ส่วนดอกย่อยบนสุดจะเจริญและประกอบด้วยกลีบนอก (flowering glume) 2 กลีบ กลีบใหญ่เรียกว่า lemma กลีบที่เล็กกว่าซ่อนอยู่ภายในเรียกว่า palea ภายในประกอบด้วยเกสรตัวผู้ 6 อัน ยอดเกสรตัวเมีย (stigma) แยกออกเป็น 2 แฉกรูปร่างคล้ายแขนง (ภาพที่ 2)

ดอกข้าวเริ่มบานจากปลายช่อมาหาโคนช่อ ดอกในช่อหนึ่ง ๆ จะบานหมดภายใน 2 – 3 วัน ดอกหนึ่ง ๆ จะบานอยู่นานประมาณ 6 นาที หรือมากกว่า 1 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความชื้นของอากาศ ส่วนใหญ่ดอกมักจะบานที่สุดก่อนเที่ยงวัน ในเขตร้อนจะบานตั้งแต่ 9.00 – 12.00 น. แต่อาจจะช้ากว่านี้ ถ้าอากาศชื้นปกติดอกจะบานประมาณ 30 – 90 นาที แล้วจะเกิดการถ่ายละอองเกสรตัวผู้ทันทีที่ภายหลังดอกบาน เกสรตัวผู้สามารถมีชีวิตได้ 5 นาที – 50 ชั่วโมง และการงอกเริ่มภายใน 3 นาที เมื่อเริ่มตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย และการปฏิสนธิใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง หลังการถ่ายเกสรตัวผู้



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของรวงข้าว

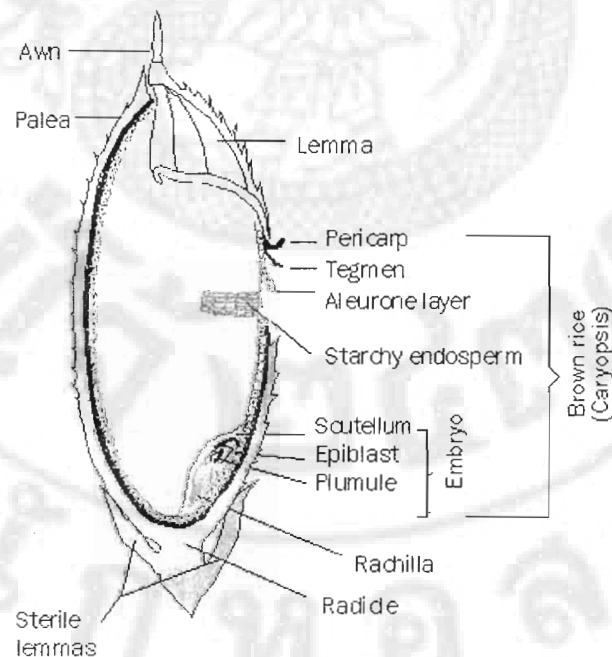
ที่มา : Webster R.K., 1992

เมล็ดข้าว (fruit)

โดยทั่วไปเรียกว่า คาริออพซิส (caryopsis) ซึ่งเป็นส่วนของเมล็ดที่ติดแน่นอยู่กับเปลือกหุ้มเมล็ด (pericarp) สำหรับข้าวเปลือกคือผลของข้าวที่มีเปลือกหุ้มผลเรียกว่า ฮัลล์ (hull) ซึ่งประกอบด้วยเปลือกชั้นนอก (palea) และชั้นใน (lemma) ซึ่งเมื่อแกะออกเป็นเมล็ดข้าวสาร โดยปกติมักมีสีขาว แต่อาจมีสีแดง หรือ น้ำตาลแดงก็ได้ ระยะออกดอกถึงสุกแก่เก็บเกี่ยวได้ประมาณ 30 วัน แต่อาจเร็วหรือช้ากว่านี้ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ปลูก (ภาพที่ 3)

ส่วนของเอมบริโอ (embryo) ซึ่งเป็นส่วนที่จะเจริญไปเป็นต้นข้าว ประกอบด้วยส่วนของใบเลี้ยง (scutellum) มีเพียง 1 ใบ ทำหน้าที่สะสมอาหาร สังเคราะห์แสงขณะเจริญอยู่เหนือดินในระยะแรก และค้ำยันเอมบริโอในระหว่างการงอก มีส่วนของเอพิบลาส (epiblast) ที่อยู่เหนือตำแหน่งของใบเลี้ยงขึ้นไป เป็นส่วนที่จะเติบโตเป็นลำต้น ใบ และดอก โดยจะมีเยื่อหุ้มอยู่ด้านบนเรียกว่า เยื่อหุ้มเอพิคอคิล (coleoptile) โดยตอนปลายสุดจะมีส่วนของยอดอ่อน (plumule) (ภาพที่ 3)

เมล็ดข้าวเมื่อแก่จะมีลักษณะแข็งแห้ง เมล็ดสีขาวหุ้มด้วยเปลือกข้าวอีกทีหนึ่ง เปลือกข้าวต้องเอาออกเสียก่อนจึงจะนำข้าวสารไปบริโภคได้ เปลือกข้าวนี้หนักประมาณ 30 - 33 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวเปลือก ข้าวสารหนักประมาณ 67 - 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวเปลือก



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา : <http://www.riceweb.org/Plant.htm#morph>

ข้าวเหนียวสันป่าตอง

ข้าวอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามคุณสมบัติของเมล็ด คือข้าวเจ้าและข้าวเหนียว โดยข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีเนื้อเมล็ดใส เมื่อหุงแล้วเมล็ดจะร่วนและสลาย ใช้รับประทานเป็นอาหารหลักของประเทศไทย ในประเทศไทยปริมาณข้าวเจ้าที่ผลิตตามภาคต่างๆ คิดเป็นร้อยละของผลผลิตทั้งหมดของภาค คือ ภาคเหนือประมาณร้อยละ 8 ภาคอีสานประมาณร้อยละ 26 ภาคกลางประมาณร้อยละ 95 ภาคใต้ประมาณร้อยละ 94

ข้าวเหนียว เป็นข้าวที่เนื้อเมล็ดขุ่นกว่าข้าวเจ้า เมื่อหุงหนึ่งแล้วเมล็ดจะเหนียวติดกัน รับประทานกันเป็นประจำในภาคเหนือและภาคอีสานตอนเหนือ และใช้ทำขนมต่าง ๆ ในภาคกลางและภาคใต้ ปริมาณข้าวเหนียวที่ผลิตตามภาคต่าง ๆ คิดเป็นร้อยละของผลผลิตทั้งหมดของภาคมีดังนี้ คือภาคเหนือประมาณร้อยละ 92 ภาคอีสานประมาณร้อยละ 74 ภาคกลางประมาณร้อยละ 5 ภาคใต้ประมาณร้อยละ 6 (www.doa.go.th/index2.php)

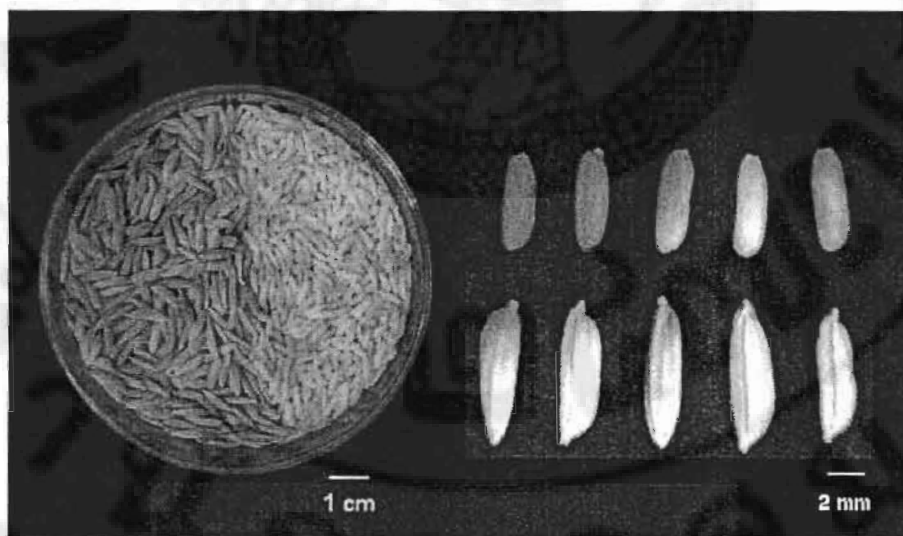
ข้าวที่ใช้ในการทดลองเป็นข้าวเหนียวสันป่าตอง ซึ่งคณะกรรมการพิจารณาให้ใช้ขยายพันธุ์เมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2505 ข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวเหนียวที่เกษตรกรนิยมปลูกมากเป็นลำดับที่สามของทางภาคเหนือ โดยข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวที่มีลักษณะที่ดี คุณภาพการขัดสีดี การหุงต้มอ่อนนุ่ม และน้ำหนักเมล็ดดี โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูงถึง 520 กิโลกรัมต่อไร่ จำหน่ายได้ราคาดีอีกทั้งยังต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลและค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ ชาวนาภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือชอบบริโภคจึงนิยมปลูกกันมาก แต่ข้อควรระวังคือ ข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะนาปีเท่านั้น อีกทั้งยังไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง, 2547ก.)

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

ข้าวเหนียว กข 6 เป็นข้าวเหนียวต้นสูง ที่ได้รับการส่งเสริมให้ปลูกในพื้นที่ทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปลูกได้เฉพาะฤดูนาปี ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยใช้รังสีแกมมาขนาด 20 กิโลเรต อาบเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้กลายเป็นพันธุ์ข้าวเหนียว แล้วนำมาปลูกคัดเลือกที่สถานีทดลองข้าวบางเขน และสถานีทดลองข้าวพิมาย จากการคัดเลือกได้ข้าวเหนียวในรุ่นที่ 2 โดยสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ KDML 105'65 – 6₂U – 68 – 254 เป็นข้าวเหนียวหอมที่มีคุณภาพดีพันธุ์แรกที่ได้จากการอาบรังสี ปรับตัวได้ดี เป็นที่นิยมปลูกและรับประทานกันมากทางคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ใช้ขยายพันธุ์ได้เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2520 และให้ชื่อว่าพันธุ์ กข 6 (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีทรงกอแผ่เล็กน้อย ใบยาวสีเขียวเข้ม ใบตรงตั้งตรง เมล็ดยาวเรียว ข้าวเปลือกสีน้ำตาล เมล็ดข้าวกล้องมีความกว้างประมาณ 2.28 มิลลิเมตร ยาว 7.23 มิลลิเมตร และหนา 1.77 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 21 พฤศจิกายน มีระยะพักตัวนานประมาณ 5 สัปดาห์ ความสูงของต้นประมาณ 154 เซนติเมตร (สถานีทดลองข้าวสันป่าดอง, 2547 ข.; ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 เมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6



ภาพที่ 5 ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

ลักษณะเด่นของข้าวเหนียว กข 6 คือ ทนแล้งได้ดีปานกลางลำต้นแข็งแรง ไม่ล้มง่าย สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี มีลักษณะต้นสูงเหมาะกับนาที่ลุ่ม รวงยาว เมล็ดยาว โดยได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพาะปลูกในทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีพื้นที่เพาะปลูกโดยรวมจำนวน 15,110,061 ไร่ และมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ 276 ถึง 504 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ข้อมูลผลผลิตเฉลี่ยในการปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ในประเทศไทย

พื้นที่ ¹ (ไร่)		เกษตรกร ¹		วิชาการ ²			
ปลูก	เก็บเกี่ยว	แหล่งปลูก	ผลผลิต (กก./ไร่)	ฤดูปลูก	แหล่งทดลอง	ผลผลิต (กก./ไร่)	ปีที่ทดลอง
2,275,195	2,117,847	ภาคเหนือ	504	นาปี 2544/45	ภาคเหนือ และภาค ตะวันออก	670	2508-2520
12,818,928	12,160,512	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	300	-	ตะวันออกเฉียงเหนือ	-	-
13,116	12,326	ภาคกลาง	371	-	-	-	-
2,822	2,822	ภาคใต้	276	-	-	-	-

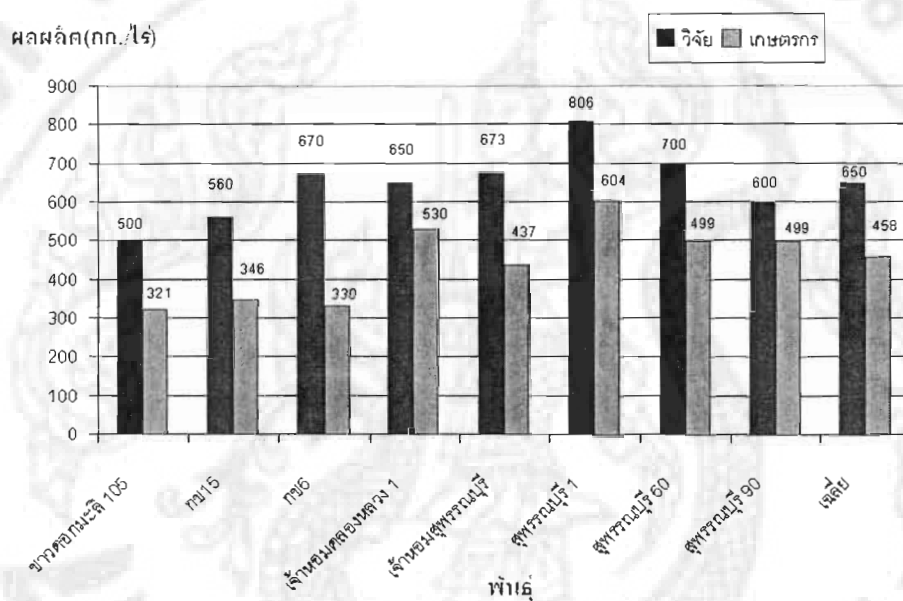
¹ สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2544/45

² เอกสารวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, 2546

- หมายถึง ไม่มีข้อมูล

ที่มา : www.doa.go.th/data-agri/RICE/1stat/st04.html

เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ พบว่ามีปริมาณผลผลิตค่อนข้างสูงเมื่อทำการปลูกเพื่อการวิจัย แต่ถ้าปลูกโดยเกษตรกรจะพบว่าผลผลิตค่อนข้างต่ำกว่าพันธุ์อื่น แต่ใกล้เคียงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ภาพที่ 6) เนื่องจากข้าวพันธุ์ กข 6 ค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ และใบจุดสีน้ำตาล แต่ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และแมลงบั่ว การเก็บเกี่ยวทำได้ง่าย นวดง่าย คุณภาพการสีดี และคุณภาพการหุงต้มดีมาก ได้ข้าวสุกที่มีกลิ่นหอม อ่อนนุ่ม แต่มีข้อเสีย คือ เป็นพันธุ์ที่ปลูกได้เฉพาะฤดูนาปี หากปลูกเป็นระยะเวลานานจะกลายเป็นข้าวเจ้าได้ง่าย (กรมวิชาการเกษตร, 2546)



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์อื่น ๆ

ที่มา : www.doa.go.th/data-agri/ RICE/1stat/st04.html

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

เนื่องจากข้าวเป็นพืชผสมตัวเอง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบัน จึงทำได้โดยง่าย ซึ่งจะทำให้สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่จะเกิดขึ้นได้ง่าย เช่น การรับละอองเกสรจากต้นอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ การควบคุมการผสมตัวเองของข้าว เป็นต้น ซึ่งวิธีการต่าง ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีดังนี้ (สถาบันวิจัยข้าว, 2546)

1. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิม

การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีนี้ มีมากมายหลายวิธี ได้แก่ การรวมรวมพันธุ์จากแหล่งอื่น การคัดเลือกพันธุ์ การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ผสมที่กระจายตัว และการสร้างพันธุ์ข้าวลูกผสม

1.1. การรวบรวมพันธุ์จากแหล่งอื่น

เป็นการนำเอาพันธุ์ข้าวจากแหล่งอื่นเข้ามาปลูกภายในพื้นที่ปลูก แล้วทดลองคัดเลือกพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดี เพื่อนำไปขยายพันธุ์ และใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการอื่น ๆ ต่อไป

1.2. การคัดเลือกพันธุ์

เป็นการคัดเลือกจากพันธุ์เดิมที่มีอยู่ แต่อาศัยกลไกการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะที่เด่นออกมาจากต้นข้าวจำนวนมากทั้งหมด แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อไป

1.3. การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ผสมที่กระจายตัว

เป็นการผสมพันธุ์ โดยมีการคัดเลือกต้นพ่อและแม่ เพื่อนำเอาลักษณะที่เด่นของพ่อและแม่มารวมไว้ด้วยกัน โดยหวังเพื่อจะให้ลักษณะที่ดี ซึ่งอาจไม่เคยปรากฏมาก่อนเกิดขึ้นมา และทำการคัดเลือกพันธุ์ให้ลักษณะนั้นคงอยู่ต่อไป

1.4. การสร้างพันธุ์ข้าวลูกผสม

เป็นการสร้างข้าวลูกผสมจากต้นพ่อ และแม่ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน เพื่อให้ลูกผสมที่ได้ มีความแข็งแรง หรือมีลักษณะบางอย่างเหนือพ่อ และแม่

วิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นจะต้องอาศัยระยะเวลาอันยาวนาน ในขั้นตอนต่าง ๆ เช่น การคัดเลือกพ่อและแม่พันธุ์ การผสมและปลูกคัดเลือกต้นพันธุ์ ตลอดจนการปลูกทดลองภายในสถานีทดลองต่าง ๆ และในพื้นที่ของเกษตรกร ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเป็นไปอย่างช้า ๆ แต่ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ลักษณะที่ต้องการคงอยู่ภายในสายพันธุ์นั้น ๆ ได้ตลอดไป

2. การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีการสมัยใหม่วิธีหนึ่ง ซึ่งจะอาศัยวิธีการต่าง ๆ นำมาประยุกต์ใช้ เพื่อให้การปรับปรุงพันธุ์ทำได้รวดเร็วมากขึ้นกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม และได้ลักษณะพันธุ์ตรงตามที่ต้องการ วิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ได้รับความนิยมในการศึกษามากขึ้น ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเชื่อมโยงโปรโตพลาสต์ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การใช้โมเลกุลเครื่องหมาย และการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เป็นต้น

2.1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เป็นการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่ดี โดยมีการคัดเลือกจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Somaclonal variation) โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพต่าง ๆ ที่ต้องการให้พืชมีคุณสมบัติเหล่านั้น เช่น ความเค็ม ความต้านทานต่าง ๆ ดังนั้นต้นพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้จึงมีคุณสมบัติที่ต้องการ แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ต่อไป

2.2. การเชื่อมโปรโตพลาสต์

วิธีการนี้อาศัยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และหลอมรวมโปรโตพลาสต์ของต้นพ่อและแม่พันธุ์ แล้วทำการคัดเลือกโดยการวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป ซึ่งจะต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ ในการป้องกันเซลล์ที่มีความบอบบาง และแตกได้ง่าย นอกจากนี้ยังอาจได้พืชที่มีลักษณะแปลกไป และอาจใช้ประโยชน์ไม่ได้ เช่น มีรากเหมือนมะเขือเทศ และมีผลแบบมันฝรั่ง (ศิริศักดิ์, 2547) เป็นต้น

2.3. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

เป็นวิธีการที่ทำให้ข้าวเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระดับยีน เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การเพิ่มขึ้นของยีน โครโมโซม การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุล อาจทำให้ยีนที่มีลักษณะเด่นกลายเป็นลักษณะด้อย และยีนที่มีลักษณะด้อยกลายเป็นลักษณะเด่นได้ ซึ่งวิธีการต่าง ๆ ที่นำมาใช้ ได้แก่ การฉายรังสี และการใช้สารเคมี เช่น โคโลซิซิน เป็นต้น แล้วทำการคัดเลือกต้นพันธุ์ต่อไป วิธีการนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม

2.4. การใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

เป็นการนำเอาความรู้เกี่ยวกับการทำแผนที่ยีน ซึ่งมีการกำหนดตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ และนำเอาโมเลกุลเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ที่ต้องการ ตามลักษณะที่สนใจ ซึ่งจะทำให้การผสมและคัดเลือกพันธุ์ใช้ระยะเวลาที่สั้นลงกว่าเดิม

2.5. การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามามีใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จะทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการในระยะเวลาอันสั้น และไม่เกิดการสูญเสียลักษณะที่ดีของแต่ละพันธุ์ไป ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีนี้มีลักษณะคล้ายกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม คือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม และเกิดการย้ายยีนในพืช เช่นเดียวกัน แต่จะแตกต่างกันตรงที่ไม่มีข้อจำกัดในการย้ายยีนซึ่งสามารถมาจากสิ่งมีชีวิตใดก็ได้

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

ในปัจจุบันเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความสนใจ และนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยการถ่ายยีนซึ่งควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าไปในข้าว ซึ่งจะทำให้ได้ข้าวที่มีลักษณะพันธุ์ตรงตามที่ต้องการ และยังสามารถคงลักษณะที่ดีของพันธุ์เดิมไว้ โดยใช้ระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบอื่น ๆ ซึ่งได้มีการนำมาใช้ในข้าวหลายชนิด เช่น ข้าวพันธุ์บาสมาดิ 370 (Rashid *et al.*, 1996) พันธุ์ Vajram (Ramesh *et al.*, 2004) พันธุ์ Konansou (Ozawa *et al.*, 2003) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (กิตติพัฒน์, 2543; ลาวัลย์และคณะ,

2543) พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (เกษตรศาสตร์ และคณะ, 2548) และพันธุ์ขาวดาแห่ง 17 (อนุรักษ์ และ สุพัตรา, 2543) เป็นต้น

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่นิยมนำมาใช้ในการถ่ายยีนในข้าวมี 2 วิธีการ คือ การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และการใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย ซึ่งทั้ง 2 วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าไปสู่เซลล์ข้าว

1. การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

การถ่ายยีนด้วยวิธีนี้ เป็นการนำยีนที่ต้องการมาเคลือบบนอนุภาคทองคำ หรือทังสเทน ซึ่งมีขนาดเล็ก และส่งเข้าไปภายในเซลล์ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค โดยอาศัยแรงดันจากก๊าซเฉื่อย และจึงทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนต่อไป

วิธีการนี้เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับการนิยมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (กิตติพัฒน์, 2543; ลาวัลย์และคณะ, 2543) สุพรรณบุรี 1 (เกษตรศาสตร์, 2548)

2. การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

วิธีการนี้เป็นการนำยีนที่ต้องการถ่ายเข้าไปสู่เซลล์พืช โดยอาศัยเชื้ออโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการส่งถ่ายพลาสมิดที่ดัดแปลงแล้วเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ และต้นที่ได้ลักษณะตามต้องการ นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 (Rashid et al., 2001)

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย (สุรินทร์, 2545)

เชื้ออโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอยู่ในดินสามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้ บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปมได้เรียกว่า crown gall disease และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมนั้นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถคงสภาพเช่นเดิมอยู่ได้ คือ เจริญเติบโตได้เร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใด แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

กลไกต่าง ๆ เหล่านี้เกิดขึ้นจากพลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid หรือ Ti - plasmid) ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140 - 325 กิโลเบส โดยเนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดขึ้นจะมีดีเอ็นเอบางส่วนแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชอย่างถาวร เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T - DNA โดยขอบเขตของ T - DNA จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช จะเป็นลำดับเบสซ้ำ อยู่ 2 ข้างของ T - DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB)

สิ่งที่น่าสนใจ คือ ยีนที่อยู่ใน T - DNA ทั้งหมดเหมือนกับยีนของพืช มีโปรโมเตอร์ (promoter) เทอร์มิเนเตอร์ (terminator) และตำแหน่งที่ใช้เติมเบส poly A ที่พบในยูคาริโอท โดยยีนเหล่านี้จะไม่แสดงออกในเซลล์ของ *Agrobacterium* แต่สามารถแสดงออกในเซลล์ของพืชที่ได้รับ T - DNA

ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรีย

ปัจจัยต่าง ๆ หลายอย่างมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เช่น ชิ้นส่วนพืช วิธีการถ่ายยีน และการเพาะเลี้ยงร่วม สายพันธุ์แบคทีเรีย เป็นต้น ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นปัจจัยที่สำคัญดังนี้ (นิตยศรี, 2536)

1. ลักษณะชิ้นส่วนพืช (explant)

ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน จะต้องมีความสามารถในการเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นต้นได้ค่อนข้างสูง จึงนิยมเลือกใช้แคลลัสที่มีลักษณะเป็น embryogenic calli ซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นได้ง่าย เมื่อได้รับสภาวะที่เหมาะสม

2. สูตรอาหาร

เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตทั้งของพืช และเชื้อโกรแบคทีเรีย ซึ่งสูตรอาหารเหล่านี้มีผลต่อกระบวนการต่าง ๆ ในการถ่ายยีน ทำให้ได้ลักษณะของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม และเซลล์ของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าบุกรุกและส่งถ่ายยีน

3. เชื้อโกรแบคทีเรีย

เชื้อโกรแบคทีเรีย และพลาสมิดที่เหมาะสม ในการถ่ายยีน มีผลต่อชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิดต่างกัน โดยจะทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่างกัน เนื่องจากความสามารถของเชื้อที่มีต่อกลไกการถ่ายยีนต่างกัน นอกจากนี้พลาสมิดที่ใช้ยังมีส่วนต่อการส่งถ่ายยีน การตรวจสอบ และคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับยีนอีกด้วย

4. วิธีการถ่ายยีน

วิธีการถ่ายยีนควรจะสามารถกระตุ้นการเข้าบุกรุก (infection) ของเชื้อโกรแบคทีเรียได้ โดยส่วนใหญ่แล้วเชื้อโกรแบคทีเรียที่เข้าบุกรุกจะมีการแสดงออกของ *vir* gene ซึ่งจะถูกกระตุ้นได้ด้วยสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) จากพืช หากชิ้นส่วนพืชไม่สามารถผลิตสารดังกล่าวได้ จำเป็นต้องมีการเติมสารที่คล้ายคลึงกันลงไป

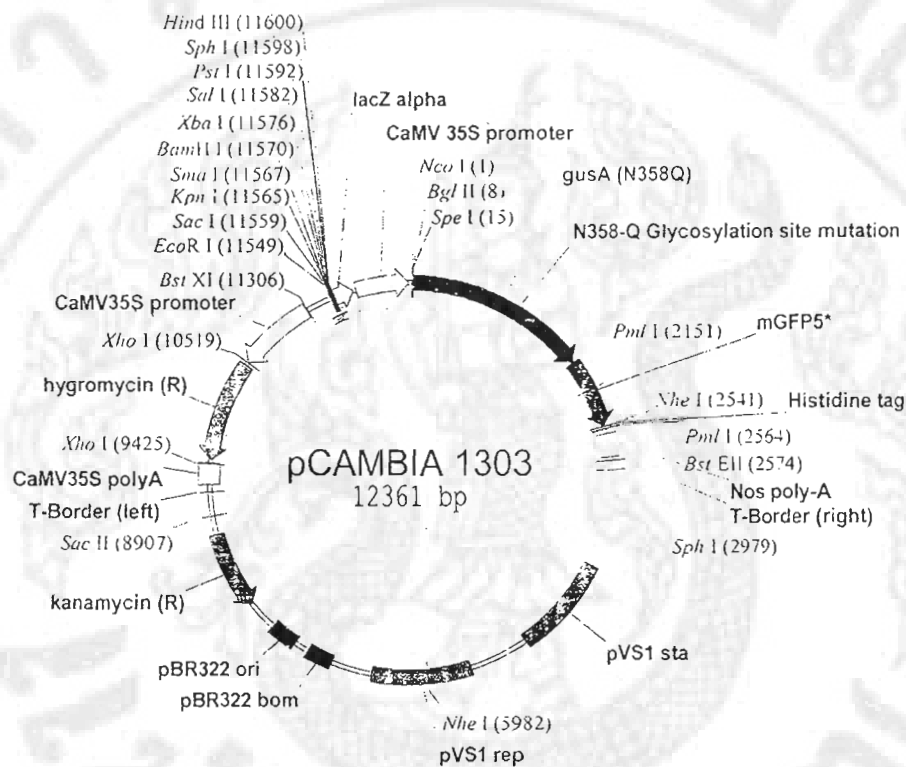
5. สภาวะต่าง ๆ

สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่าง ๆ เป็นสิ่งสำคัญที่จะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออก และเปลี่ยนแปลงตามกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์พืช และเชื้อโกรแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยในเรื่องของแสง อุณหภูมิ และสารเคมีต่าง ๆ

ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผล

ยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) มีข้อแตกต่างกัน คือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้คัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนที่ถ่ายฝากลงไปได้ง่าย ๆ เพื่อตรวจสอบผลสำเร็จของการถ่ายยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบได้ว่าโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และสามารถแสดงออกได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใด

ตัวอย่างพลาสมิดใช้ในการถ่ายยีนในข้าว เช่น pCAMBIA 1303 (ภาพที่ 7) ซึ่งเป็น Ti - plasmid ของ *Agrobacterium tumefaciens* มียีนเครื่องหมาย คือ *hptII* ซึ่งทำให้พืชที่ได้รับยีนมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (hygromycin) และมียีนรายงานผล คือ ยีน *gusA* ซึ่งผลิตเอนไซม์ β - glucuronidase ที่สามารถเปลี่ยนสาร X - gluc ให้เป็นสารสีฟ้า



ภาพที่ 7 โครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ที่มา: <http://www.cambia.org/daisy/cambia/materials/vectors/585.html>

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวได้มีการศึกษามากมายทั้งในและต่างประเทศ ซึ่งจะทำการศึกษาผลของการใช้ฮอร์โมนต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส ให้มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน และชักนำให้เกิดต้นหลังการถ่ายยีน

เฟดิมและคณะ (2536) ได้ทำการศึกษากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าว 6 สายพันธุ์จากเมล็ดบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน NAA ร่วมกับไคเนตินในปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บาสมาติ 370 และ กข 15 สามารถเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารซึ่งเติมฮอร์โมน NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พันธุ์นางมลเอส 4 และประตูแดงเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเติมฮอร์โมน NAA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

และไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ปทุมธานี 60 เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารเต็มฮอร์โมน NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เพื่อชักนำให้เกิดต้นสูตร MS พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์นางมลเอส 4 สามารถ เกิดต้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งไม่เติมฮอร์โมนใดเลยในขณะที่พันธุ์ปทุมธานี 60 เกิดต้นได้ดีบนอาหารที่มีไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พันธุ์กข 15 สามารถเกิดต้นได้เมื่อ เพาะเลี้ยงบนอาหารซึ่งเติมไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์บาสมาดิ 370 และประตูแดง เกิดต้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมไคเนติน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในขณะที่ประภาและพรทิพย์ (2537) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 เช่นกัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน 2,4 - D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ สูงสุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด เท่ากับ 6.9 มิลลิเมตร และแคลลัส สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ แต่ลาวัลย์และคณะ (2543) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้อาหารสูตรเดียวกับประภาและพรทิพย์ (2537) แต่มีการดัดแปลงโดยมี การเติม น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และเคซีนไฮโดรไลเซต 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะได้แคลลัสที่ เหมาะสมต่อการถ่ายยีน

Toki (1997) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Nipponbare และ Kitaake โดยใช้อาหารสูตร N6 ซึ่งมี 2,4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 2.8 กรัมต่อลิตร และเจลโลห์ 2 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์ เพื่อใช้ในการถ่ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ Ozawa และคณะ (2003) ที่ทำการ เพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Konansou แต่ในการชักนำให้เกิดต้นแตกต่างกันโดย Toki (1997) ใช้อาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA เข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 2 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซอร์บิทอล 30 กรัมต่อ ลิตร และเจลโลห์ 3 กรัมต่อลิตร แล้วจึงชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ซึ่งมี น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลโลห์ 2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Ozawa และคณะ (2003) ใช้อาหารสูตร N6 ซึ่งมี NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลโลห์ 4 กรัมต่อลิตร

กิตติพัฒน์ (2543) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS และสูตร R3 ในที่มีดอญภูมิ 28 องศา เซลเซียส โดยมีเป้าหมายเพื่อให้เกิด embryogenic calli และใช้ในการถ่ายยีน ซึ่งพบว่าอาหาร สูตร R3 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด embryogenic calli ได้ดี พร้อมทั้งพบว่าการเติม สารอินทรีย์ เช่น L-proline หรือ L - tryptophan จะทำให้ได้แคลลัสชนิด embryogenic calli จำนวนมาก และมีขนาดใหญ่

Rashid และคณะ (2001) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ Super Basmati พบว่าอาหารสูตร N6 ชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่า อาหารสูตร MS โดยมีเปอร์เซ็นต์การ

เกิดแคลลัสสูงสุด คือ 87.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อทำการชักนำให้เกิดต้นพบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มี NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดต้นได้สูงถึง 45.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA ต่ำ และ BAP สูง จะทำให้เพิ่มการเกิดต้นของข้าวได้

Amin และคณะ (2004) ชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวบังคลาเทศพันธุ์ BR - 8 ด้วยอาหารสูตร MS ซึ่งมี 2,4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ไบโอ - อินโนซินทอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 3 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 25 วัน เมื่อทำการชักนำให้เกิดต้นจึงเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saharan และคณะ (2004) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ HKR - 46 และ HKR - 126 โดยใช้อาหารสูตร MS ซึ่งมี 2,4 - D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลไลท์ 2.5 กรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ ส่วนการชักนำให้เกิดต้นจะทำการดึ่งน้ำออกจากเซลล์เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลไลท์ 6 กรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตร MS ซึ่งมี 2ip (N - isopentenylaminopurine) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลไลท์ 2 กรัมต่อลิตร

Pipatpanukul และคณะ (2004) พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดีของข้าวพันธุ์ กข 6 ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดกับอาหารสูตร N6 ซึ่งมีฮอร์โมน 2,4 - D เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง เป็นเวลานาน 28 วัน เพื่อใช้ในการถ่ายยีน และสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ภายใน 45 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เกตุศุคนธ์และคณะ (2548) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีน บนอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4 - D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง และก่อนชักนำให้เกิดต้น ทำการดึ่งน้ำออกจากแคลลัสเป็นเวลา 5 วัน แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และเคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

สุพรรณภูมิและประดิษฐ์ (2548) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 หอมสุพรรณบุรี และปทุมธานี 1 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยพบว่าข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4 - D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับข้าวหอมสุพรรณบุรี และสามารถใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 - D เข้มข้น 2 และ

3 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เช่นเดียวกัน ส่วนข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4 - D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ทั้ง 3 พันธุ์สามารถชักนำให้เกิดต้น โดยทำการตักน้ำออกจากแคลลัสเป็นเวลา 4 วัน แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนในข้าว

Toki (1997) ทำการถ่ายยีนในข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Nipponbare และ Kitaake โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pIG121Hm โดยการเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรียบนอาหารสูตร AB ซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วละลายเซลล์ในอาหารสูตร AAM จากนั้นนำแคลลัสมาเขย่าร่วมกับสารละลายของเชื้อนาน 2 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร 2N6 - AS ในที่มีดเป็นเวลานาน 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน และคาร์เบนนิซิลลิน

Mohanty และคณะ (1999) ทำการถ่ายยีนในข้าว Pusa Basmati 1 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTOK233 โดยการเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรียในอาหารเหลว AB ซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วเก็บเซลล์ และละลายในอาหารสูตร AAM ซึ่งมี acetosyringone เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยให้มีความการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 จากนั้นนำแคลลัสมาเขย่าร่วมกับสารละลายของเชื้อนาน 30 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร 3/2MSAS ในที่มีดเป็นเวลานาน 4 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน

ลาวัลย์และคณะ (2543) ทำการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ทำการเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรีย จนกระทั่งมีความการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.01 แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับแคลลัสอายุ 11 วัน บนอาหารสูตร NB ที่มี 2,4 - D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ในที่มีดเป็นเวลานาน 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน

Rashid และคณะ (2001) ถ่ายยีนในข้าวบาสมати 370 บาสมати 385 และบาสมати 6129 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pIG121Hm โดยการเลี้ยงเชื้อ อโกรแบคทีเรียในอาหารเหลว YEP ซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ขำคิน แล้วเก็บเซลล์ และละลายในอาหารสูตร AA - AS จากนั้นนำแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์มาแช่ในสารละลายของเชื้อนาน 3 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลานาน 2 - 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน และคาร์เบนนิซิลลิน

อนุรักษและนิตยศรี (2544) ทำการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105, LBA4404 และ AGL-1 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ทำการเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรีย จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.01 แล้วจึงหยุดการละลายของเชื้อ เพื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับแคลลัสบนอาหารสูตร NB ที่มี 2,4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน

ในขณะที่ Kumria และคณะ (2002) ทำการถ่ายยีนในข้าว Pusa Basmati 1 โดยใช้เชื้อ อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pTOK233 หรือ pMVR1ODC โดย การเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรียในอาหารเหลว YEM ซึ่งมียากานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 - 0.4 แล้วเก็บเซลล์ และละลายในอาหารสูตร MS ซึ่งมี acetosyringone เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลซูโครส หรือ มอลโทส 30 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอล 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำแคลลัสมาเขย่า ร่วมกับสารละลายของเชื้อนาน 10 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันในที่มืดเป็นเวลา 2 - 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียาไฮโกรมัยซิน และซีโฟแทคซิม

Ramesh และคณะ (2004) ทำการถ่ายยีนในข้าวอินดิกา เพื่อให้ต้านทานต่อหนอนกอสี ครีม และแมลงดูดน้ำเลี้ยง โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pSB111 ซึ่งมียีนสร้างเดลตา - เอนโดทอกซิน และแลคติน ด้วยการเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรีย ในอาหารเหลวสูตร ABG ซึ่งมียา spectinomycin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเซลล์ และละลายในอาหารสูตร PIM II ซึ่งมี acetosyringone เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำแคลลัสซึ่งผ่านการแช่ในอาหารสูตร MS ซึ่งมี acetosyringone เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที มาเขย่าร่วมกับสารละลายของเชื้อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลานาน 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหารซึ่งมียา phosphotricin

Pipatpanukul และคณะ (2004) สามารถถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pBI121 และ pCAMBIA 1301 ตามลำดับ โดยการเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรีย ในอาหารเหลว LB ซึ่งมียากานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำแคลลัสมาเขย่าร่วมกับ สารละลายของเชื้อนาน 30 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกัน ในที่มืดเป็นเวลานาน 3 วัน แล้วจึงทำการคัดเลือกบนอาหาร

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวและเชื้อแบคทีเรีย

ในการทดลองใช้เมล็ดแก่ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 กข 10 สันป่าตอง สันป่าตอง 1 เหนียวแพร่ เหนียวเมืองปาย และเหนียวดำ ซึ่งได้มาจากสถานีทดลองข้าวสันป่าตอง อำเภอ สันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์ Kitaake และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง คือ เชื้ออโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ AGL1 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1303 ที่มียีนต้านทานต่อยาไฮโกรมัยซินเป็นยีนสำหรับคัดเลือก และยีน *gus* สร้าง เอนไซม์ β - glucuronidase เป็นยีนรายงานผล

ข้าวญี่ปุ่น เชื้ออโกรแบคทีเรีย และพลาสมิด pCAMBIA ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวมาลอกเปลือกออก ทำการฆ่าเชื้อด้วย 10% sodium hypochlorite 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง วางเมล็ด ข้าวลงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของโพรีนและ 2,4-D ต่างๆกัน นำไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 สัปดาห์ สังเกตการเกิดแคลลัส ขนาด และลักษณะของ แคลลัส

การชักนำให้เกิดต้น

นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เหมาะสมเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งมีการเติม NAA และไคเนตินที่เหมาะสม เลี้ยงใน สภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดจุดสีเขียว และการ เกิดต้นอ่อน หลังจากนั้นจึงย้ายต้นอ่อนลงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนเพื่อให้เจริญเป็นต้น ที่สมบูรณ์ต่อไป แล้วย้ายต้นปลูกลงดินในโรงเรือนกระจก

การศึกษาปริมาณยาไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เหมาะสมเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์มาเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ดัดแปลงซึ่งมีการเติมยาไฮโกรมัยซิน เข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 30 มก./ล. เลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็น เวลานาน 2 สัปดาห์ สังเกตการเจริญของแคลลัส

การถ่ายยีน

การถ่ายยีนทำได้โดยเลี้ยงเชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ซึ่งมีพลาสมิด pCambia 1303 โดยใช้วิธีการดัดแปลงจาก Toki (1997) หรือจาก Pipatpanukul และคณะ (2004) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 – 0.5 จากนั้นจึงเติมสารละลาย acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ แล้วทิ้งไว้นาน 1 – 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นแช่แคลลัสในสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้พร้อมกับเขย่าเป็นเวลานาน 30 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลานาน 3 วัน แล้วจึงล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง และสารละลายไทเมนทินเข้มข้น 150 มก./ล. แล้วเลี้ยงบนอาหารสำหรับคัดเลือก

การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay

วิธีการตรวจสอบการถ่ายยีนจะใช้วิธี GUS Assay (Jefferson *et al.*, 1987) โดยการสุมแคลลัสมาทดสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ β - glucuronidase หลังการเพาะเลี้ยงร่วม และหลังจากเลี้ยงบนอาหารสำหรับคัดเลือกเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำใบข้าวประมาณ 100 มิลลิกรัม มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Hwang and Kim (2000) โดยบดใบข้าวในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติมสารละลาย mCTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 โมลาร์, Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 50 มิลลิโมลาร์, PVP 1%, sodium metabisulfite 0.5%, β -mercaptoethanol 1%) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้ แล้วเติมคลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดโปรตีน จากนั้นบั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นน้ำ แล้วเติม absolute ethanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในข้าวโดยเทคนิคพีซีอาร์

ตรวจสอบข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิคพีซีอาร์ในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิก ดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรมเมอร์ 25 พิโคโมล และ Taq DNA polymerase (Fermentas) 1.25 หน่วย โดยใช้ไพรมเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ คู่ที่ 1 คือ FgusA-1 (Biobasic) 5'-TGA AGA TGC GGA CTT ACG TG-3' และ RgusA-1 (Biobasic) 5'-GGC ACA GCA CAT CAA AGA GA-3' คู่ที่ 2 คือ FhptII (BSU) 5'-CTT GAC ATT GGG GAG TTT AGC GAG A-3' และ RhptII (BSU) 5'-ATC GGC GAG TAC TTC TAC ACA GCC A-3'

ไพรมเมอร์คู่ที่ 1 จำเพาะต่อ ยีน gusA ไพรมเมอร์คู่ที่ 2 จำเพาะต่อยีน hptII ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) ที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส

นาน 1 นาที (Denaturation) 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส
นาน 1 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
จากนั้นวิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis



ผลการทดลองและวิจารณ์

การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียว

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่าง ๆ บนอาหารสูตร N6D

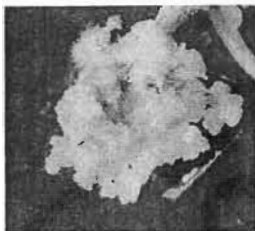
การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวบนอาหารสูตร N6D ซึ่งมีโปรลีน 2.88 ก./ล. (Toki, 1997) หรือ 1.44 ก./ล. และ 2,4-D 2 มก./ล. พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่าง ๆ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่างๆที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D

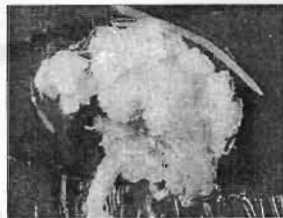
สายพันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	
	โปรลีน 2.88 ก./ล.	โปรลีน 1.44 ก./ล.
Kitaake	70.34	57.08
ข้าวเหนียวสันป่าตอง	39.50	32.41
ข้าวเหนียวแพร่	42.38	46.67
ข้าวเหนียวเมืองปาย	23.52	33.33
ข้าวเหนียว กข6	37.72	48.36
ข้าวเหนียวดำ	38.40	46.67

ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ต่างๆแสดงดังภาพที่ 8 ก.-ง. พันธุ์กข 6 เกิดแคลลัสมีสีเหลืองอ่อน แบ่งตัวเป็นเม็ดเล็กขนาดประมาณ 1-2 มม. มีลักษณะร่วนซุย ส่วนพันธุ์สันป่าตอง เหนียวแพร่ และเหนียวดำมีลักษณะคล้ายกันคือมีสีเหลืองเข้มกว่าพันธุ์กข 6 เล็กน้อย แบ่งตัวเป็นก้อนกลมขนาดประมาณ 3-4 มม. มีลักษณะกลมแน่น ไม่ร่วนซุย

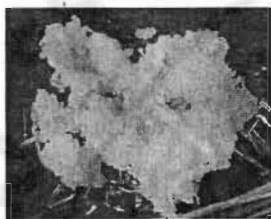
ก.



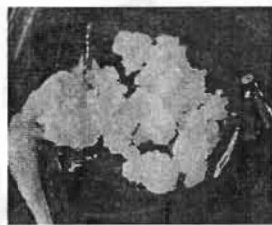
ข.



ค.



ง.



ภาพที่ 8 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ก.) กข 6 ข.)
เหนียวสันป่าตอง ค.) เหนียวแพร่ และ ง.) เหนียวดำ

การเกิดแคลลัสของข้าวแต่ละสายพันธุ์บนอาหารสูตร N6D (Toki, 1997) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การเจริญและลักษณะของแคลลัสแตกต่างกันทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับ genotype ของแต่ละสายพันธุ์ อาหารสูตร N6D ของ Toki (1997) เหมาะสำหรับข้าวญี่ปุ่น ซึ่งเป็นข้าว *japonica* แต่ข้าวไทยเป็นข้าว *indica* ดังนั้นควรจะต้องมีการศึกษาองค์ประกอบในอาหารโดยปรับให้เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของข้าวแต่ละสายพันธุ์ เช่นมีการปรับฮอร์โมนที่เหมาะสมและสารอินทรีย์อื่นๆ

งานวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยใช้อาหารสูตร N6D และเติมโพรลีน ตามวิธี ของ Toki (1997) ซึ่งเหมาะกับข้าว Kitaake ซึ่งเป็นข้าว *japonica* แต่ข้าวเหนียวที่นำมาทำการศึกษานั้น เป็นข้าว *indica* ด้วยเหตุนี้อาจทำให้ข้าวบางสายพันธุ์เกิดแคลลัสน้อยกว่าที่ควรจะเป็น แต่ในงานวิจัยของอนุชา (2542) ได้ใช้ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ต่างๆใกล้เคียงกัน

ผลของโพรลีน และ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่าง ๆ

จากรายงานวิจัยที่มีการใช้โพรลีน ในการปรับปรุงสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงแคลลัส ดังเช่นรายงานของ Moura (1997), Burikam (2002), Hsia (1998) และ Chuowdhry (1993) พบว่ารายงานวิจัยส่วนใหญ่ที่กล่าวมานั้น โพรลีนมีผลต่อการสร้างแคลลัส และ embryogenic callus แต่โพรลีนนั้นมีราคาแพงมาก จึงควรหาปริมาณที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดแคลลัสและช่วยลดต้นทุนวิจัยในลำดับต่อไป

การศึกษาถึงผลของโพรลีน ในครั้งนี้ ได้ใช้วิธีทางสถิติเข้ามาช่วยประมวลผลดังนั้น จึงควรให้ความสำคัญ ต่อตัวแปรทุกตัวที่จะทำให้เกิดความผิดพลาด เช่น เมล็ดข้าวที่นำมาใช้นั้น ควรเป็นเมล็ดที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง ๆ เพื่อที่จะได้ลดค่า standard error ซึ่งในการทดลองนี้ ผู้วิจัย ไม่ได้ทำการทดสอบเมล็ดพันธุ์ก่อนทำการทดลอง จึงทำให้เกิด ความคลาดเคลื่อนในการ ทดลองเนื่องจากเมล็ดพันธุ์จำนวนมากไม่เกิดแคลลัส

ในการตัดสินใจพิจารณาลักษณะของแคลลัส และ embryogenic callus นั้นเป็นการ ตัดสินที่ยากมากเนื่องจาก ลักษณะของ embryogenic callus ของข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความ แตกต่างกัน ดังนั้น การตัดสินใจลักษณะของ embryogenic callus ของสายพันธุ์ใด ๆ ไม่ควรนำ เกณฑ์จากสายพันธุ์อื่นมาเปรียบเทียบ ควรดูภาพรวม และ ใช้เกณฑ์ในสภาวะที่เกิด embryogenic callus ที่ดีที่สุด มาเป็นหลักในการตัดสินใจ embryogenic callus ของข้าวในแต่ละ สายพันธุ์ หรืออาจนำแคลลัสที่ไม่อาจตัดสินใจได้ว่าเป็น embryogenic callus หรือไม่ ไปส่อง ภายใต้อกล้องสเตอริโอเพื่อดูลักษณะแคลลัสโดยละเอียดเพื่อช่วยในการพิจารณาลักษณะของ embryogenic callus

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ยึดถือหลักเกณฑ์ของการเกิด embryogenic callus โดยเลือกแคลลัสที่มีการแบ่งตัวสูง (active dividing) มีลักษณะกลม แน่น สีเหลืองอ่อน ซึ่งเป็น ลักษณะของแคลลัสที่เหมาะสมกับการถ่ายยีนโดยวิธีการใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

ระยะเวลาในการเก็บผลการทดลองของข้าวแต่ละสายพันธุ์ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ ควรให้ความสำคัญ เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสของข้าวแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน เมื่อเก็บผลในระยะเวลาเดียวกัน อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ เช่น ข้าวข6 และ กข 10 มีแคลลัสขนาดเล็กและร่วน ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ จึงจะเกิด เป็น embryogenic callus ส่วนข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวแพร์นั้น เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็น embryogenic callus ได้เร็ว ดังนั้น การเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวแพร์ใน อาหารสูตร N6D เป็นเวลานานเกินไปอาจจะส่งผลทำให้แคลลัสเกิดเป็น Risogenic callus ซึ่ง อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้น หรือเมื่อนำไปทำการถ่ายยีนจะทำให้ ประสิทธิภาพลดลง ส่วนข้าวเหนียวสันป่าตอง มีการเจริญตามปกติ ประมาณ 3-4 สัปดาห์ก็จะ เกิดเป็น embryogenic callus ดังการทดลองที่ผ่านมา และสอดคล้องกับ อนุชา (2542)

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง

หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวสันป่าตองบนอาหารสูตร N6D ในสภาวะที่ใช้ 2,4-D และโพรลิน ต่างๆกัน พบว่าสภาวะที่ใช้ 2,4-D 2 มก./ล.และโพรลินความเข้มข้น 2.88 ก./ล. ให้แคลลัสที่มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนที่สุด โดยได้แคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อนและมีลักษณะกลม แน่น โดยเกิดแคลลัส 83 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสมีขนาดเฉลี่ย 1.03 เซนติเมตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 3 ผลของ 2,4-D และ โพรลิน ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสของ ข้าวเหนียวสันป่าตอง

สภาวะที่	2,4-D (มก./ล.)	โพรลิน (ก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิด แคลลัส ^a	ขนาดของแคลลัส ^b (ซม.)
1	0.00	0.00	42	0.75
2	0.00	0.72	52	0.87
3	0.00	1.44	50	0.96
4	0.00	2.88	52	0.97
5	2.00	0.00	65	0.82
6	2.00	0.72	75	0.99
7	2.00	1.44	67	0.88
8	2.00	2.88	83	1.03
9	3.00	0.00	81	0.68
10	3.00	0.72	73	0.84
11	3.00	1.44	66	1.05
12	3.00	2.88	65	0.8
13	4.00	0.00	64	0.81
14	4.00	0.72	67	0.86
15	4.00	1.44	61	0.75
16	4.00	2.88	63	0.96

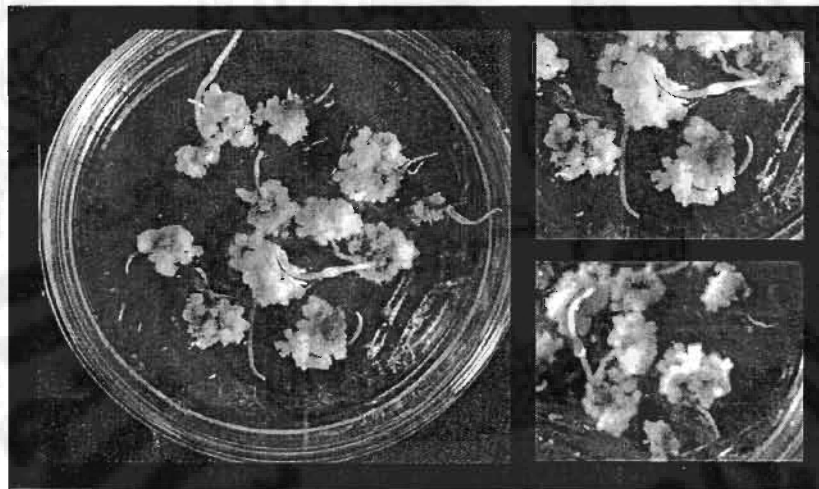
หมายเหตุ

a ; (จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส / จำนวนเมล็ดข้าวเหนียวสันป่าตองทั้งหมด)×100

b ; (กว้าง × ยาว)/2

จากการศึกษาผลของ 2,4-D และโพรลีน พบว่าเมื่อ 2,4-D เพิ่มขึ้นทำให้การเกิดแคลลัสดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่ม 2,4-D เป็น 3 และ 4 มก./ล. พบว่าการเกิดแคลลัสลดลง ในการทดลองนี้ สภาวะที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือใช้ 2,4-D 2 มก./ล. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ประภา และพรทิพย์ (2537) ที่ทำการทดลองโดยใช้ข้าวหอม พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง (96.3%)

ในส่วนของโพรลีนเมื่อปริมาณเพิ่มขึ้นทำให้ขนาดแคลลัสใหญ่ขึ้น ยังไม่มีรายงานที่สรุปอย่างแน่ชัดว่าโพรลีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดจึงทำให้ได้แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น Chowdhry และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลของโพรลีนในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าว Pusa 169 พบว่าโพรลีนจะช่วยส่งเสริมให้เกิดเป็น embryogenic callus ได้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยให้เป็นต้นได้ดีขึ้น ด้วยโดยให้เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นสูงถึง 63% เมื่อเปรียบเทียบกับไม่ใส่โพรลีนที่ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นเพียง 23% โดยโพรลีนที่ทำการศึกษาคืออยู่ในช่วง 3-12 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 9 ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล และ โพรลีน 2.88 ก./ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในที่ไม่มีแสง และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีโพสลิโน หรือเติมโพสลิโน 1.44 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสงจะทำให้ได้กลุ่มแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ใกล้เคียงกัน คือ มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 11.61 และ 11.71 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในสภาวะที่มีอาหารที่มีโพสลิโน และอาหารที่ไม่มีโพสลิโน จะให้ขนาดของกลุ่มแคลลัส เท่ากับ 9.00 และ 8.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4; ภาพที่ 10)

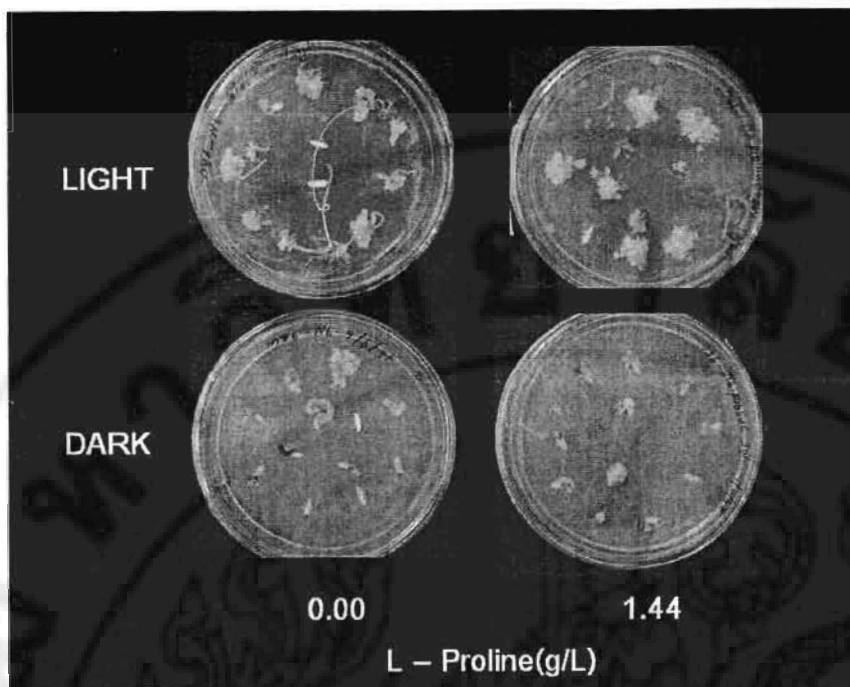
แต่จากการสังเกตลักษณะของแคลลัส พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงจะทำให้ได้กลุ่มของแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่า แคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด โดยแคลลัสที่ได้จากอาหารที่มีโพสลิโนในสภาวะที่มีแสง มีลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการถ่ายยีนได้ดีกว่า คือ แคลลัสมีสีเหลือง ลักษณะกลมแน่น (ภาพที่ 11)

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

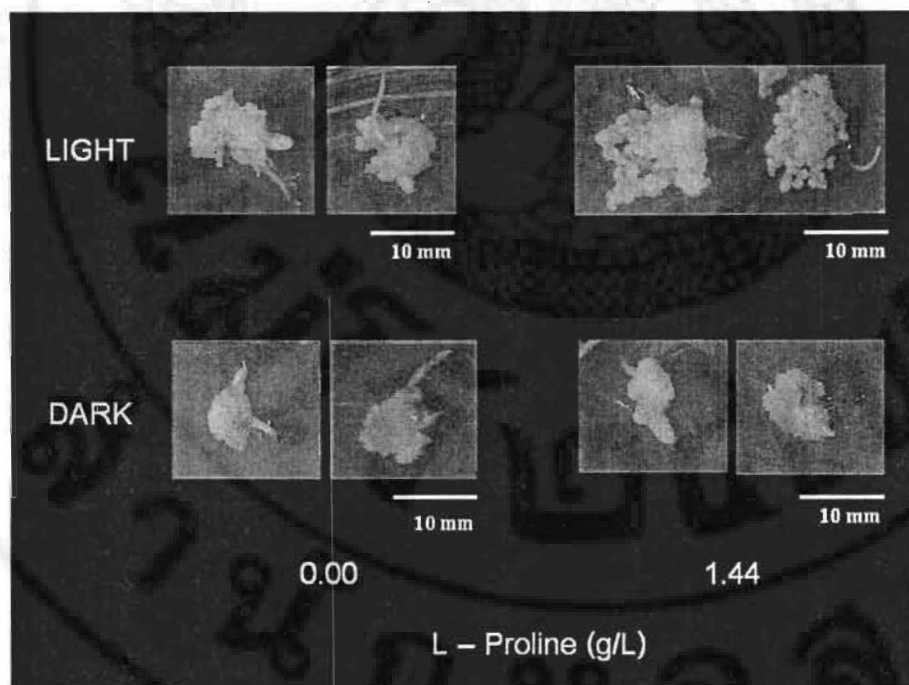
สภาวะ	ปริมาณโพสลิโน (ก./ล.)	% การเกิดแคลลัส*	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย* (มม.)
สว่าง	0.00	71.43 ^a	11.61 ^a
	1.44	75.71 ^a	11.71 ^a
มืด	0.00	67.41 ^a	8.03 ^b
	1.44	70.00 ^a	9.01 ^b
F – test		ns	*

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี LSD



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบการเกิดแคลลัสในแต่ละสภาวะการทดลอง



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะแคลลัสในแต่ละทรีตเมนต์

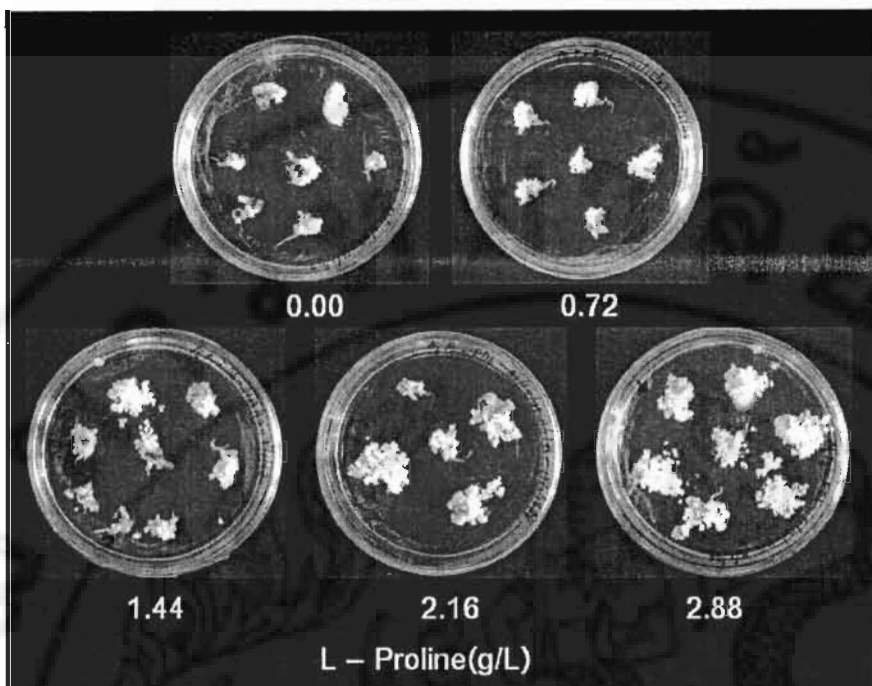
ผลของโพรลินที่มีต่อการเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีโพรลิน 1.44 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด เท่ากับ 80.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโพรลิน 2.88, 0.72, 0.00 และ 2.16 กรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 74.00, 72.00, 70.00 และ 66.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

เมื่อทำการวัดขนาดของกลุ่มแคลลัส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีโพรลิน 2.88 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีขนาดของกลุ่มแคลลัสมากที่สุด เท่ากับ 14.38 มิลลิเมตร และแคลลัสมีลักษณะกลมแน่น สีเหลืองอ่อน รองลงมาเป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโพรลิน 2.16, 0.72, 1.44 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีขนาดของกลุ่มแคลลัสเท่ากับ 13.12, 10.34, 10.32 และ 10.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5; ภาพที่ 12 และ 13)

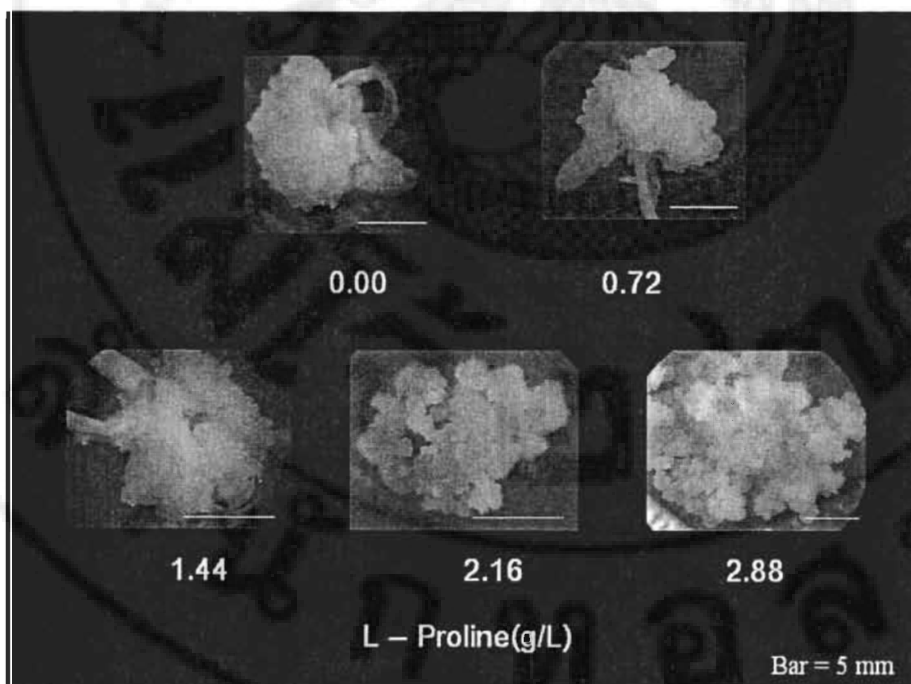
ตารางที่ 5 ปริมาณโพรลินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ในสภาวะที่มีแสง

ปริมาณโพรลิน(ก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส*	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย* (มม.)
0.00	70.00 ^a	10.10 ^b
0.72	72.00 ^a	10.34 ^b
1.44	80.00 ^a	10.32 ^b
2.16	66.00 ^a	13.12 ^a
2.88	74.00 ^a	14.38 ^a
F – test	ns	*

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบการเกิดแคลลัสที่ระดับโปรลีนต่าง ๆ



ภาพที่ 13 ลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับโปรลีนระดับต่าง ๆ กัน

ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารสูตร N6 ดัดแปลง ซึ่งมีการเติมฮอร์โมน 2,4 - D ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 2.88 กรัมต่อลิตร แล้วเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง จะสามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด ซึ่งการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวอินดิกา บางสายพันธุ์ในที่ที่มีแสง จะได้แคลลัสที่มีลักษณะที่ดีกว่าในที่มืด (เผติม และคณะ, 2536; ประภา และพรทิพย์, 2537) และมีการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวหลายพันธุ์สำหรับใช้ในการถ่ายยีนในที่ที่มีแสง เช่น พันธุ์ Konansou (Ozawa, 2003) สุพรรณบุรี 1 (เกศสุนทร, 2548) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดีของข้าวพันธุ์ กข 6 ต้องใช้ฮอร์โมน 2,4 - D ในระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Pipatpanukul, *et al.* , 2004) โดยระดับฮอร์โมนที่สูงนี้คล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 หอมสุพรรณบุรี (สุพรรณภูมิ, 2548) แต่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งใช้ระดับฮอร์โมน 2,4 - D ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า คือ ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประภา และพรทิพย์, 2537)

การเติมโพรลีนในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัสจะได้แคลลัสที่เป็น embryogenic calli และขนาดของแคลลัสที่ได้ใหญ่ขึ้น และมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นสูงขึ้น แต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่ชัดเจนต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว (กิตติพัฒน์, 2543) นอกจากนี้การเติมสารอินทรีย์ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซต ทรีปโตเฟน yeast extract glutamine เป็นต้น จะทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้นได้ (ประภาและพรทิพย์, 2537; George E.F., 1993)

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 บนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่ไม่มีการเติม 2,4-D นั้นเมล็ดข้าวพัฒนาเป็นต้นและรากไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น (ภาพที่ 14) ส่วนอาหารสูตร N6D ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดถึง 75.00% รองลงมาคือความเข้มข้น 2.0, 4.0 และ 0.5 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 64.58%, 54.18% และ 41.67% ตามลำดับ แสดงว่า 2,4-D มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 (ตารางที่ 6) โดยความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงมากเกินไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง ผลการทดลองที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับรายงานของอนุชา (2542) ที่ว่าความเข้มข้น 2,4-D ที่สูงเกินไปคือ ที่ 4.0 มก./ล. มีผลทำให้การชักนำให้เกิดแคลลัสลดลงรวมถึงแคลลัสที่ได้มีลักษณะสีคล้ำ และความเข้มข้นของ 2,4-D ที่น้อยเกินไป เช่น 0, 0.5, และ 1 มก./ล. จะมีผลส่งเสริมทำให้เกิดรากหรือยอดเป็นต้นที่สมบูรณ์รวมทั้งทำให้เกิดแคลลัสได้น้อยลง

ขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นพบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ 1.0 มก./ล. ให้แคลลัสขนาดใหญ่ถึง 0.86 ซม. และ 0.83 ซม. แต่ลักษณะของแคลลัสมีราก (ภาพที่ 15) ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสมที่จะนำไปถ่ายยีน ขนาดของแคลลัสที่รองลงมาคือความเข้มข้น 2.0 และ 4.0 มก./ล. มีขนาด 0.79 และ 0.67 ซม. ตามลำดับ

เมื่อพิจารณา 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. และ 4 มก./ล. ซึ่งให้แคลลัสที่มีลักษณะเหมาะสมพบว่าอาหาร N6D ที่มีความเข้มข้น 2,4-D 2.0 มก./ล. มีขนาดของแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าความเข้มข้น 2,4-D 4.0 มก./ล. (ตารางที่ 6) ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

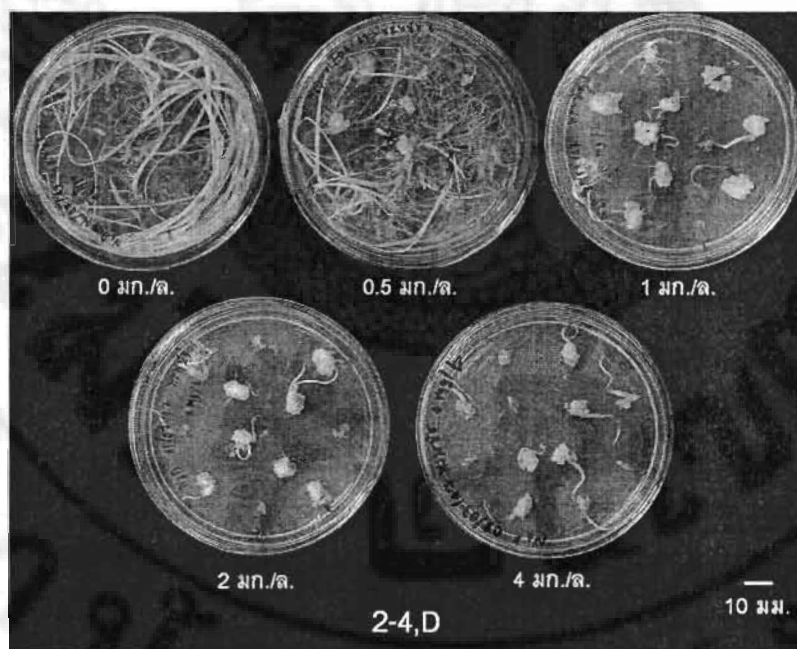
จากภาพที่ 15 จะเห็นได้ว่าแคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มก./ล. มีลักษณะเป็น compact callus ซึ่งยังไม่ใช่ embryogenic callus ที่มีลักษณะ กลม แน่น สีเหลืองอ่อน (globular, compact, yellow) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่จะส่งผลให้ได้ embryogenic callus ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนต่อไป

ตารางที่ 6 การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เลี้ยงบนอาหาร N6D ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

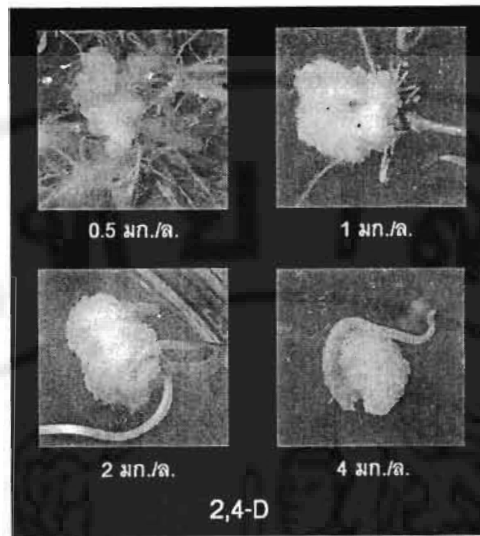
ความเข้มข้นของ 2,4-D (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ขนาดเฉลี่ยของแคลลัส (ซม.)
0.0	0.00 ^d	0.00 ^c
0.5	41.67 ^c	0.86 ^a
1.0	75.00 ^a	0.83 ^a
2.0	64.58 ^{ab}	0.79 ^{ab}
4.0	54.18 ^{bc}	0.67 ^b
F-test	*	*

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี LSD



ภาพที่ 14 การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 15 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ในอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. และเติมโพรลีนความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 7) แสดงว่าโพรลีนไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

ขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นพบว่าโพรลีนความเข้มข้น 2.88 ก./ล. ให้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดถึง 0.78 ซม. รองลงมาคือความเข้มข้น 1.44, 0.72 และ 0 ก./ล. มีขนาดแคลลัส 0.72, 0.70 และ 0.61 ซม. ตามลำดับ แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีโพรลีนจะมีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีโพรลีน (ภาพที่ 16) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรลีนพบว่าขนาดของแคลลัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 7)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัสหลังจากการย้ายแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ ลงบนอาหารใหม่ สูตรเดิมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการแบ่งตัวมากขึ้น โดยเฉพาะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีโพรลีน 2.88 ก./ล. มีลักษณะเป็นก้อนกลม สีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นลักษณะของ embryogenic callus จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Toki (1997) ที่ว่าการเติม casamino acids และโพรลีนทำให้เกิดแคลลัสที่เหมาะสมในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นจึงเลือกการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. และโพรลีนความเข้มข้น 2.88 ก./ล. เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

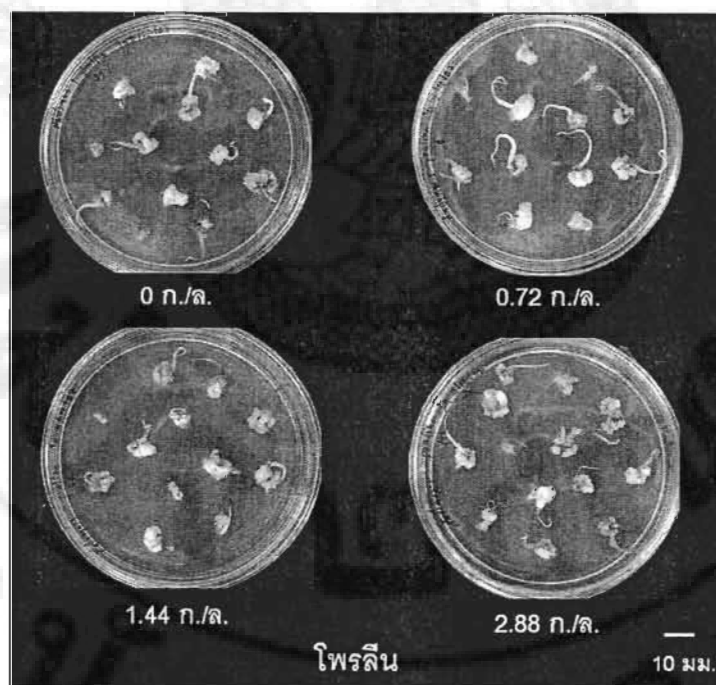
ตารางที่ 7 การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล.และมีโพรลีนความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของโพรลีน (ก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	ขนาดเฉลี่ยของแคลลัส (ซม.)
0.00	75.00	0.61 ^b
0.72	68.75	0.70 ^a
1.44	75.00	0.72 ^a
2.88	79.17	0.78 ^a
F test	ns	*

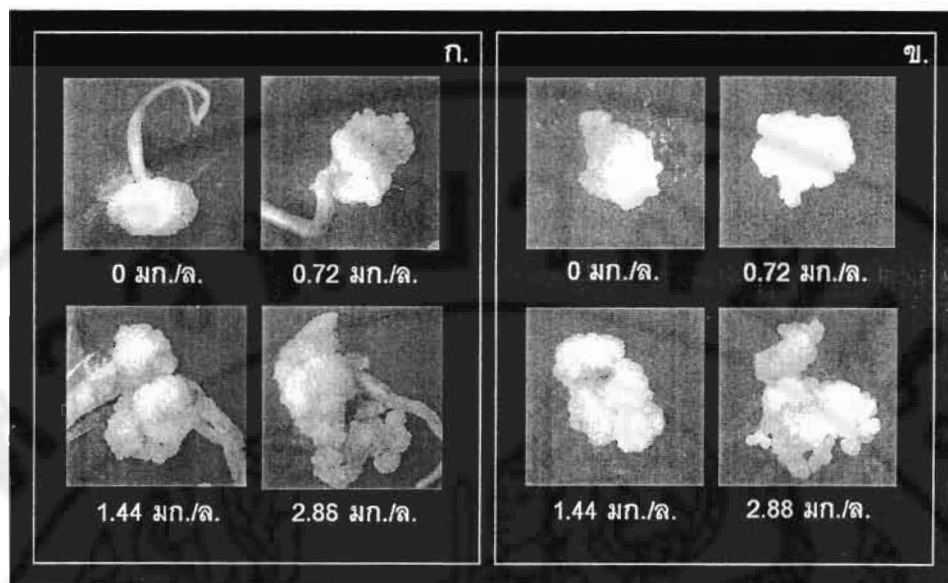
หมายเหตุ

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี LSD



ภาพที่ 16 การเกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของโพรลีนต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์



ภาพที่ 17 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มีโพสลิความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ก.) หลังจาก subculture ลงอาหารใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ข.)

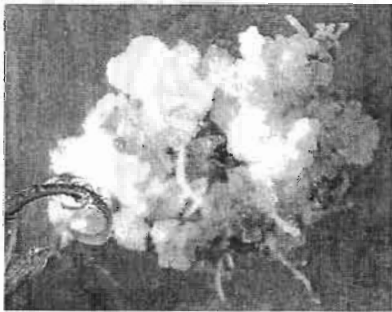
การพัฒนาเป็นต้นข้าวเหนียว

การชักนำให้แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ เกิดเป็นต้น

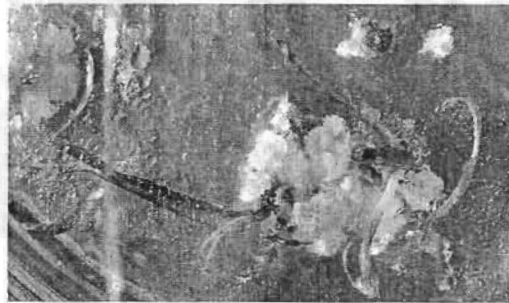
หลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวบนอาหารสูตร N6D เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นทำการย้ายแคลลัสลงบนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA 1 mg/l และ Kinetin 2.5 mg/l (Toki, 1997) เพื่อชักนำให้เกิดต้น ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นคำนวณจากจำนวนต้นที่เกิดต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ

หลังจากย้ายแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ลงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นประมาณ 7-10 วัน แคลลัสของข้าวเหนียวจะเกิดจุดสีเขียว ยกเว้นข้าวเหนียวดำเกิดจุดสีเขียวและสีม่วง (ภาพที่ 18) จุดสีเขียวและสีม่วงจะพัฒนาเป็นต้นข้าวในที่สุด เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นของพันธุ์ กข 6 เหนียวสันป่าตอง เหนียวแพร่ และ เหนียวดำ คือ 50, 10, 15 และ 27 ตามลำดับ ภาพที่ 19 แสดงต้นข้าวเหนียวที่พัฒนาสมบูรณ์พร้อมปลูกลงดิน

ก.



ข.



ภาพที่ 18 ก.) แคลลัสของข้าวเหนียวดำเกิดจุดสีม่วงและเขียว และ ข.) แคลลัสของข้าวเหนียวดำที่กำลังพัฒนาเป็นต้น

ก.



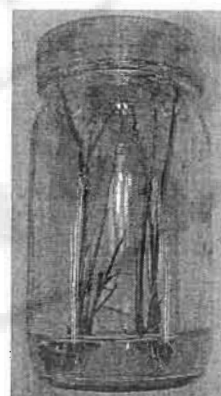
ข.



ค.



ง.



ภาพที่ 19 ต้นข้าวเหนียวที่พัฒนามาจากแคลลัสของพันธุ์ ก.) กข 6 ข.) เหนียวสันป่าตอง ค.) เหนียวแพร่ และ ง.) เหนียวดำ

การชักนำให้แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองเจริญเป็นต้น

เมื่อย้ายแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล และโพรีน 2.88 ก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณ NAA และ kinetin ระดับต่างๆ กัน พบว่าอาหารที่เติม NAA 0.2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล. พบว่าแคลลัสเกิดเป็นจุดสีเขียวได้สูงที่สุดคือ 90.61 เปอร์เซ็นต์ แต่สภาวะที่ไม่มีฮอร์โมน NAA และ kinetin ทำให้แคลลัสเกิดต้นสูงที่สุดคือ 13.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8 และภาพที่ 20) เมื่อนำต้นข้าวปลูกลงดิน ต้นข้าวสามารถเจริญได้ปกติและผลิตเมล็ดได้

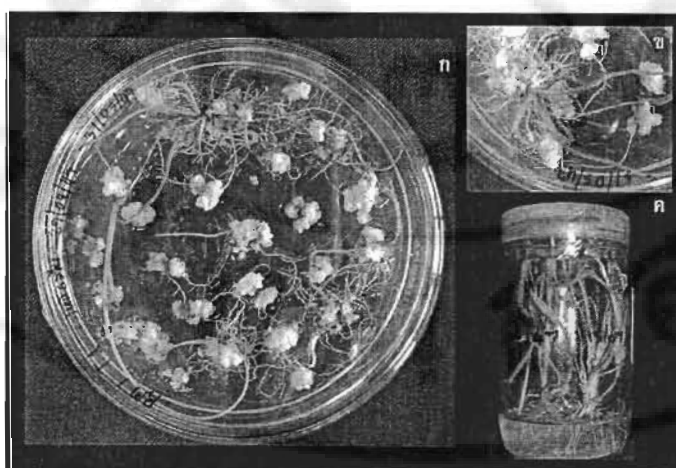
ตารางที่ 8 อิทธิพลของ NAA และ Kinetin ต่อประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้น

สภาวะที่	ความเข้มข้นของ NAA (มก./ล.)	ความเข้มข้นของ Kinetin (มก./ล.)	%แคลลัสที่เกิดจุด เขียว ^a	% การเกิดต้น ^b
1	0.0	0.0	70.83	13.4
2	0.2	1.0	74.73	1.16
3	0.2	2.0	90.61	3.17
4	0.2	3.0	75.05	0
5	0.5	1.0	84.05	0
6	0.5	2.0	74.24	0
7	0.5	3.0	64.00	0

หมายเหตุ

a ; เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น = (จำนวนต้น / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) × 100

b; เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดจุดเขียว = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) × 100



ภาพที่ 20 แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้น

ก. และ ข. คือ แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในสภาวะที่ 1

ค. คือ ต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสเกิดยอดและรากที่สมบูรณ์

การชักนำให้แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เจริญเป็นต้น

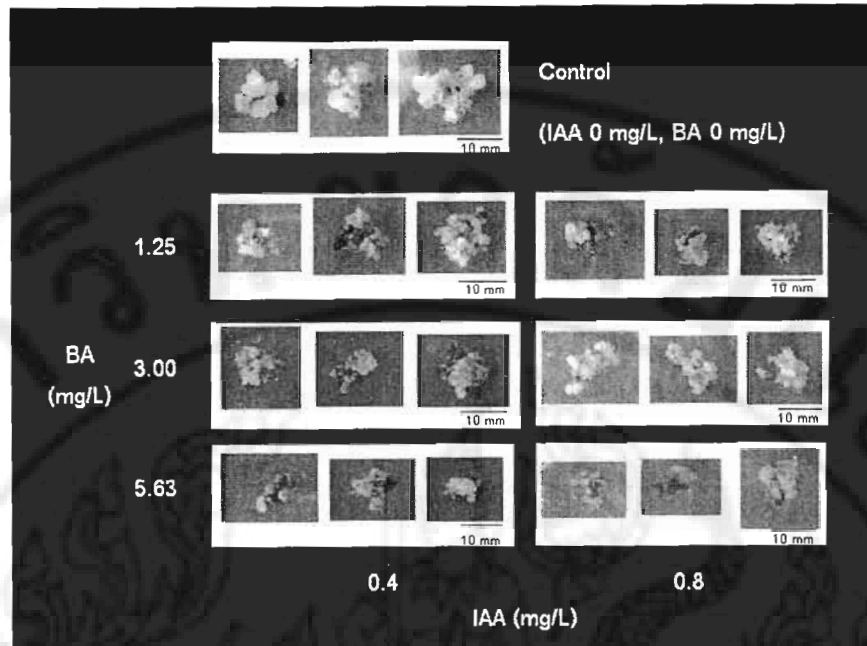
การชักนำให้เกิดขึ้นของแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ซึ่งมีการเติมฮอร์โมน IAA ร่วมกับ BA ในปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่า แคลลัสจะไม่เกิดการพัฒนาไปเป็นต้น ซึ่งจะพบแคลลัสเพียงบางส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดจุดเขียวมากที่สุด คือ 11.11 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ อาหารที่เติม IAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากับ 5.56 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่มีจุดเขียวเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี IAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) โดยจะใช้ระยะเวลาประมาณ 30 – 45 วัน และไม่มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อระยะเวลาประมาณ 60 วัน แคลลัสบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีดำทุก ๆ ระดับฮอร์โมน (ภาพที่ 21)

ตารางที่ 9 ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ซึ่งเติม IAA และ BA ในปริมาณต่าง ๆ กัน

ฮอร์โมน(มก./ล.)		แคลลัสที่ไม่	แคลลัสที่เกิด	แคลลัสที่ตาย*
IAA	BA	เปลี่ยนแปลง*	จุดเขียว*	(%)
		(%)	(%)	
0.0	0.0	83.33 ^{ab}	0.00 ^c	25.00 ^{abc}
0.4	1.3	83.33 ^{ab}	0.00 ^c	22.22 ^{bc}
0.4	3.0	75.00 ^{abc}	0.00 ^c	30.56 ^{ab}
0.4	5.6	80.56 ^{abc}	11.11 ^a	13.89 ^{bc}
0.8	1.3	61.11 ^c	0.00 ^c	40.67 ^a
0.8	3.0	72.22 ^{bc}	5.56 ^b	27.78 ^{abc}
0.8	5.6	94.44 ^a	0.00 ^c	11.11 ^c
F - test		*	*	*

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



ภาพที่ 21 ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ซึ่งมีการเติมฮอร์โมน IAA ร่วมกับ BA ในปริมาณต่าง ๆ กัน เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้น

จากการชักนำให้เกิดขึ้นโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร N6 ซึ่งเติมฮอร์โมน IAA และ BA ทำให้แคลลัสเกิดจุดสีเขียว ซึ่งแคลลัสที่นำมาชักนำให้เกิดขึ้นนี้เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมโพรลีน แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ตามที่ Pipatpanukul และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้

ประภาและพรทิพย์ (2537) และกิตติพัฒน์ (2543) ได้รายงานว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารอินทรีย์ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซต โพรลีนจะทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้นได้ ดังนั้นจึงเลือกแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมโพรลีนมาทำการชักนำให้เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบวิธีการของ Toki (1997) และ Pipatpanukul และคณะ (2004) พบว่าแคลลัสเกิดจุดเขียวทุกทรีตเมนต์ ยกเว้นอาหารสูตร N6 ซึ่งไม่เติมฮอร์โมนจะเกิดการแบ่งตัวของแคลลัสเท่านั้น โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไโคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดจุดเขียวมากที่สุด คือ 77.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ซึ่งไม่เติมฮอร์โมนใดเลย 75.00 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร N6 ที่เติม IAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 60.00 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร MS ซึ่งเติม BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 40.00 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร N6 ซึ่งเติม BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 22.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10; ภาพที่ 22)

นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร N6 กลุ่มแคลลัสจะมีลักษณะร่วน ไม่จับตัวกันแน่น ซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตร MS ซึ่งกลุ่มแคลลัสจะจับตัวแน่น แต่บางส่วนจะ

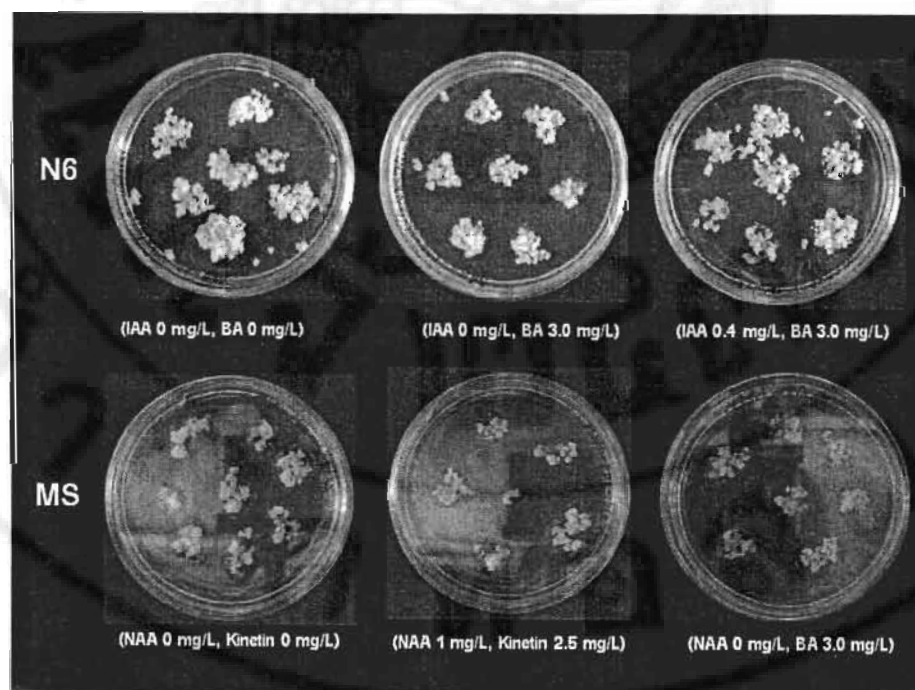
เริ่มมีสีดําเกิดขึ้น นอกจากนี้จะสังเกตเห็นยอดเล็ก ๆ สีเขียว เกิดขึ้นบนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร MS ซึ่งไม่เติมฮอร์โมน หรือเติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่เลี้ยงบนอาหาร N6 และ MS ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน

สูตรอาหาร	ฮอร์โมน (มก./ล.)				แคลลัสที่ไม่เปลี่ยนแปลง*	แคลลัสที่เกิดจุดเขียว*
	IAA	NAA	BA	Kinetin	(%)	(%)
N6	-	-	-	-	95.00 ^a	0.00 ^e
	-	-	3.0	-	72.50 ^b	22.50 ^b
	0.4	-	3.0	-	35.00 ^d	60.00 ^b
MS	-	-	-	-	20.00 ^e	75.00 ^a
	-	1.0	-	2.5	17.50 ^e	77.50 ^a
	-	-	3.0	-	52.50 ^c	40.00 ^c

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี LSD



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบการเกิดพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 และ MS ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน

การชักนำให้เกิดต้นโดยการเปรียบเทียบวิธีการของ Toki (1997) และ Pipatpanukul และคณะ (2004) ทำให้แคลลัสเกิดจุดสีเขียว และบางทรีดเมนต์มีขนาดเล็ก ๆ เกิดขึ้นแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ซึ่งใช้เวลานานกว่า 60 วัน และมีรายงานของ Saharan และคณะ (2004a) และ สุพรรณภูมิและประดิษฐ์ (2548) ได้ทำการดิงน้ำบางส่วนออกจากแคลลัส แล้วชักนำให้เกิดต้น พบว่ามีประสิทธิภาพในการเกิดต้นสูง และรวดเร็ว

ดังนั้นจึงนำแคลลัสไปทำการดิงน้ำออกบางส่วนเป็นเวลานาน 5 วัน (ภาพที่ 23) แล้วจึงทำการชักนำให้เกิดต้นโดยเปรียบเทียบวิธีการของ Toki (1997) และ Pipatpanukul และคณะ (2004) พร้อมทั้งทดลองใช้อาหารสูตร DKN เพื่อลดอาการที่แคลลัสเกิดสีดำเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ตามคำแนะนำของ Dr.Ozawa K.(2003)

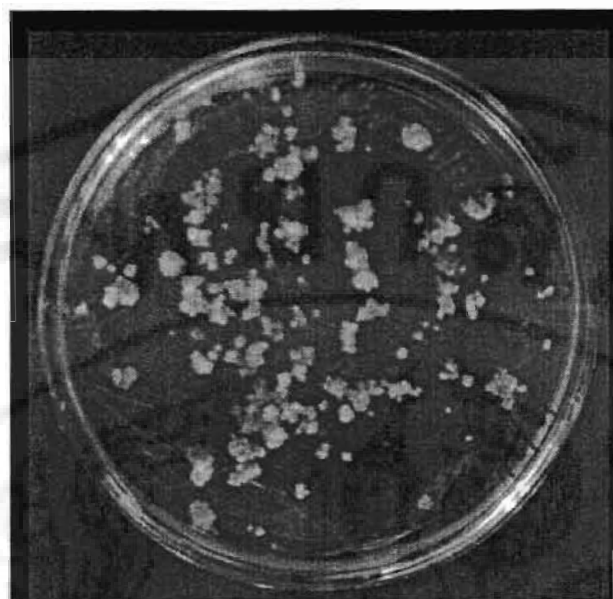
เมื่อทำการชักนำให้เกิดต้น หลังนำแคลลัสไปดิงน้ำออกบางส่วนบนอาหารสูตร N6 MS และ DKN ซึ่งเติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน พบว่าแคลลัสเกิดจุดเขียวบนอาหารสูตร N6 MS และ DKN ทุกทรีดเมนต์ ในระยะเวลา 10 – 18 วัน บางกลุ่มเกิดยอดเล็ก ๆ และราก ยกเว้นอาหารสูตร N6 แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีดำและแห้ง แต่บางส่วนเกิดรากเล็ก ๆ โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดการพัฒนาดันอ่อนได้สูงที่สุด คือ 12.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11; ภาพที่ 24 และ 25)

ตารางที่ 11 ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ดิงน้ำออกบางส่วนแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร N6, MS และ DKN ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน

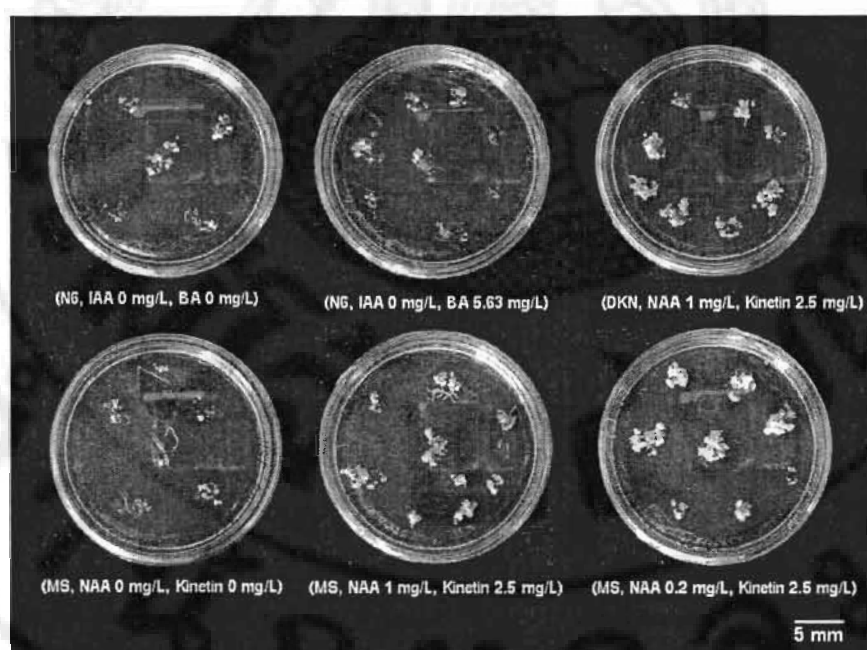
สูตรอาหาร	ฮอร์โมน (มก./ล.)				แคลลัสที่ไม่เปลี่ยนแปลงหรือตาย*	แคลลัสที่เกิดจุดเขียว*	แคลลัสที่เกิดจุดเขียวและราก*	แคลลัสที่เกิดราก*	ต้นอ่อนทั้งหมด*
	IAA	NAA	BA	Kinetin	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
N6	-	-	-	-	43.75 ^b	9.38 ^c	3.13 ^b	6.25 ^b	0.00 ^b
	0.4	-	3.0	-	81.25 ^a	18.75 ^{bc}	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
MS	-	-	-	-	37.50 ^{bc}	25.00 ^{abc}	0.00 ^b	6.25 ^b	6.25 ^b
	-	0.2	-	2.5	25.00 ^{ab}	40.63 ^{ab}	21.88 ^a	0.00 ^b	12.50 ^a
	-	1.0	-	2.5	25.00 ^{ab}	56.25 ^a	6.25 ^b	0.00 ^b	12.50 ^a
DKN	-	1.0	-	2.5	31.25 ^b	50.00 ^a	0.00 ^b	18.75 ^a	0.00 ^b
F - test					*	*	*	*	*

หมายเหตุ

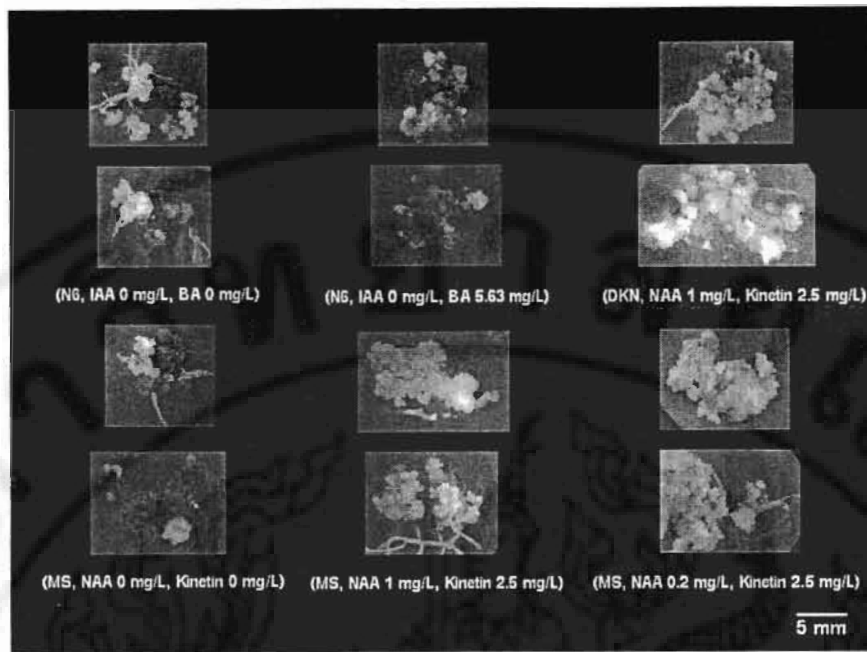
* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



ภาพที่ 23 ลักษณะแคลลัสที่ผ่านการดิ่งน้ำออกบางส่วน เป็นเวลานาน 5 วัน



ภาพที่ 24 เปรียบเทียบการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่ดิ่งน้ำออกบางส่วนแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 , MS และ DKN ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน



ภาพที่ 25 แคลลัสที่ต้งน้ำออกบางส่วนแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 , MS และ DKN ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ กัน

การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 บนอาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดต้นได้มากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ ช่อทิพา และคณะ (2547) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสอดคล้องกับการชักนำให้เกิดต้นกับการทดลองที่มีการใช้อาหารที่เติมไคเนตินเพียงอย่างเดียว หรือมีปริมาณไคเนตินสูงกว่าฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน ซึ่งจะทำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (เผติม และคณะ, 2536; ประภาและพรทิพย์, 2537) พันธุ์บาสมmati 370 กข 15 ปทุมธานี 60 (เผติม และคณะ, 2536) หอมคลองหลวง1 หอมสุพรรณบุรี ปทุมธานี1 (สุพรรณภูมิและประดิษฐ์, 2548) เป็นต้น

ในขณะที่การใช้ IAA และ BA ทำให้แคลลัสเกิดจุดสีเขียวแต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ตามที่ Pipatpanukul และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยพบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารอินทรีย์ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซต โปรตีนจะทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้นได้ (ประภา และพรทิพย์, 2537; กิตติพัฒน์, 2543)

การชักนำให้เกิดต้นโดยอาหารสูตร N6 MS และ DKN พบว่าลักษณะแคลลัสที่จะเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ดี จะมีลักษณะที่กลุ่มแคลลัสจับตัวกันแน่น โดยในอาหารสูตร N6 จะทำให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะร่วน และเปลี่ยนเป็นสีดำได้ง่าย อาหารสูตร DKN จะได้แคลลัสที่มีลักษณะค่อนข้างแน่น และเกิดจุดสีเขียวบางส่วน ในขณะที่อาหารสูตร MS จะได้กลุ่มแคลลัสที่จับตัวกันแน่น มีการเกิดจุดสีเขียวจำนวนมาก และเกิดการพัฒนารากและยอดได้ดี

นอกจากนี้การดื่มน้ำบางส่วนออกจากแคลลัส จะทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นได้รวดเร็วกว่า การชักนำให้เกิดต้นแบบปกติ โดยแคลลัสจะสามารถดูดซึมฮอร์โมนที่ชักนำให้เกิดต้นได้ดี และผลของฮอร์โมนต่อเซลล์นั้นจะรวดเร็วกว่า เห็นได้จากการเกิดต้นของการเพาะเลี้ยงแคลลัส หลังการดื่มน้ำออกบางส่วน ซึ่งจะเกิดต้นอ่อนได้ภายในระยะเวลาประมาณ 18 วัน

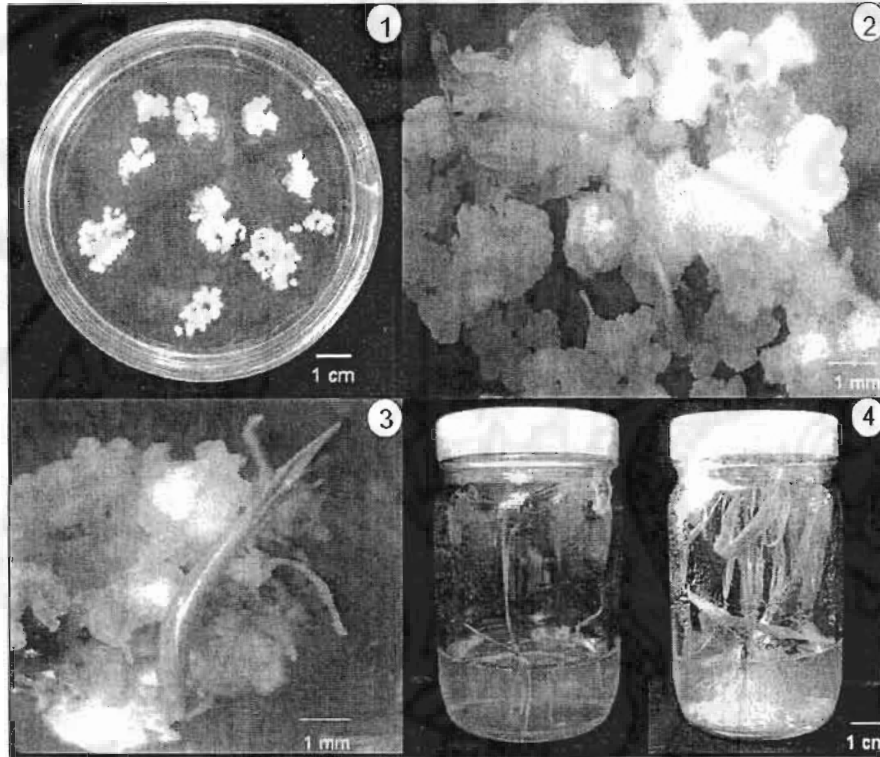
อิทธิพลของค่าแรงดันน้ำในกระบวนการของเซลล์ยังไม่สามารถอธิบายได้แน่นอน แต่เซลล์ในสภาพมีแรงดันน้ำต่ำ หรือสูญเสียน้ำในเซลล์ไป จะทำให้เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึม และเกิดการสะสมโปรตีนในเซลล์จำนวนมาก ทำให้ลดวิถีการหายใจ (respiratory pathway) ส่งผลให้เกิดความเครียด (Osmotic stress) และทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ หรือพัฒนาการของเซลล์ได้ (George E. F., 1993)

ดังนั้นการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 จะใช้วิธีการดื่มน้ำออกบางส่วนเป็นเวลานาน 5 วัน แล้วทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้เมื่อนำแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ที่มีลักษณะ กลม แน่น สีเหลืองอ่อน จากขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น คือ สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (กิตติกร, 2546) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 58 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเกตลักษณะแคลลัส พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน แคลลัสมีการขยายขนาด และแบ่งตัวมากขึ้น แคลลัสบางกลุ่มเริ่มเกิดการพัฒนาเป็นจุดเขียวที่ผิวของแคลลัส ซึ่งต่อมาจุดเขียวที่ปรากฏเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนยอดและส่วนราก หลังจากนั้นทำการย้ายต้นอ่อนที่ได้ ลงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้วเพาะเลี้ยงจนพัฒนาเป็นต้นข้าวที่มีรากและยอดแข็งแรงรวมระยะเวลาจากแคลลัสจนเป็นต้นที่สมบูรณ์ ประมาณ 45 วัน จึงทำการย้ายต้นข้าวออกปลูกลงดินแล้วเลี้ยงในโรงเรือน (ภาพที่ 26)

จากการทดลองพบว่าแคลลัสบางกลุ่มมีการพัฒนาที่ผิดปกติ ซึ่งพบเห็นได้ทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สอดคล้องกับ พรทิพย์ (2537) เช่น การที่แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำ การที่แคลลัสพัฒนาเป็นรากเท่านั้น และการที่จุดเขียวไม่พัฒนาเป็นยอดต่อ การที่แคลลัสเหล่านี้เกิดความผิดปกติเนื่องมาจากอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต การชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นจะต้องมีอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดที่เหมาะสม คือ ออกซินและไซโทไคนิน การพัฒนาแคลลัสไปเป็นยอดจะต้องมีส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินต่ำ ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโทไคนินสูง แคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงจะเกิดการพัฒนาไปเป็นราก ในขั้นตอนการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสสารพวกออกซินจะมีผลในการเพิ่มอัตรา การแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อ ออกซินที่นิยมใช้ในอาหารชักนำให้เป็นต้นคือ IAA และ NAA ซึ่งเป็นออกซินที่มีฤทธิ์รุนแรงต่ำกว่า 2,4-D ไซโทไคนินจะมีผลต่อการสร้างอวัยวะของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง ไซโทไคนินที่นิยมใช้ในอาหารชักนำให้เกิดต้น ได้แก่ Kinetin, BA และ Zeatin (อารีย์,

2541) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดและอัตราส่วนออกซินและไซโทไคนิน จึงต้องทำการศึกษาให้เหมาะสมกับพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 26 การชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

1. แคลลัสที่พัฒนาเป็นจุดเขียว
2. แคลลัสเริ่มพัฒนาจากจุดเขียวไปเป็นยอด
3. แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก
4. ต้นอ่อนที่เจริญในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน มีรากและยอดที่สมบูรณ์



ภาพที่ 26 (ต่อ)

- 5. ต้นข้าวที่นำออกปรับสภาพก่อนปลูกในโรงเรือน
- 6. ต้นข้าวอายุ 1 เดือน หลังออกปลูกในโรงเรือน
- 7,8. ต้นข้าวอายุ 3 เดือน หลังออกปลูกในโรงเรือน

การชักนำให้เกิดต้นของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ได้ทำการศึกษาหาปริมาณฮอร์โมน NAA และ kinetin ที่เหมาะสม โดยได้ทำการทดลองแบ่งเป็น 3 ตอนดังนี้

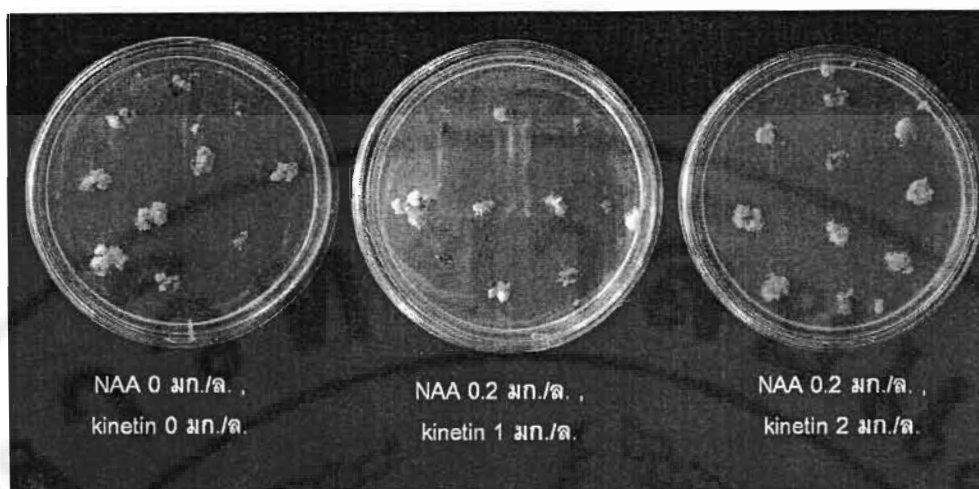
ในการทดลองครั้งแรกได้ทำการย้ายแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. (ไม่เติมโพรลิน) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาทำการชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณ NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 1 และ 2 มก./ล. พบว่าอาหารที่เติม NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2 มก./ล. ทำให้มีจำนวนแคลลัสเกิดเป็นจุดเขียวได้สูงที่สุดคือ 60.00% (ตารางที่ 12, ภาพที่ 27) แต่ลักษณะแคลลัสเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้มและดำ ไม่มีการแบ่งตัวและแคลลัสที่เกิดจุดเขียวไม่มีการพัฒนาเป็นต้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตารางที่ 12 อิทธิพลของ NAA และ kinetin ต่อการชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ NAA (มก./ล.)	ความเข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวน แคลลัส ทั้งหมด	จำนวน แคลลัสที่เกิด จุดเขียว	เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดจุด เขียว ^a
0.0	0.0	40	12	30.00
0.2	1.0	40	11	27.50
0.2	2.0	40	24	60.00

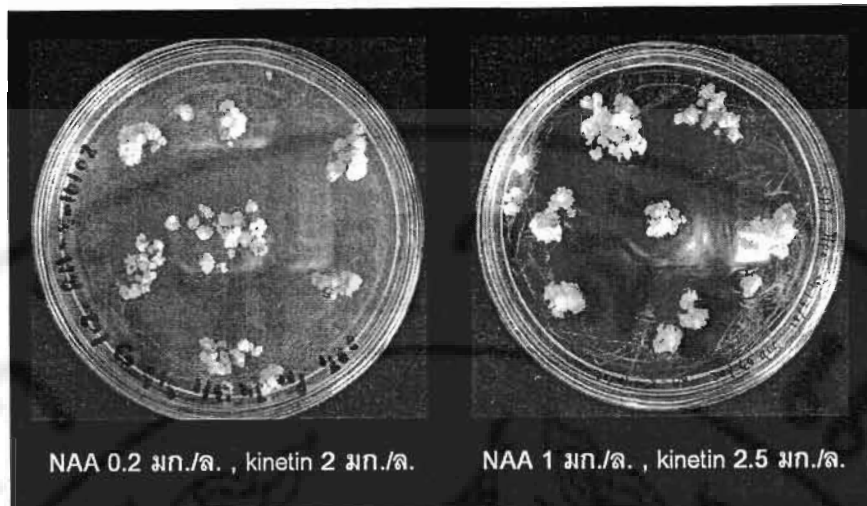
หมายเหตุ

a ; เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดจุดเขียว = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว/จำนวนแคลลัสทั้งหมด) x100

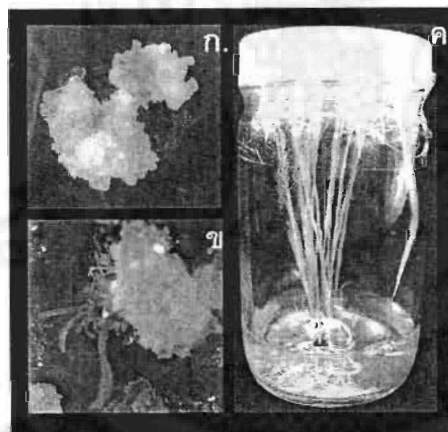


ภาพที่ 27 ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณ NAA และ kinetin ระดับต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสโดยพบว่าอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. และเดิมโพรีน 2.88 ก./ล. เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะที่ดี จึงได้นำมาทำการชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2 มก./ล. ซึ่งเป็นสภาวะที่มีจำนวนแคลลัสเกิดเป็นจุดเขียวมากที่สุด (ตารางที่ 12) และทำการชักนำให้เกิดต้นในอีกสภาวะบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ในข้าวเหนียวหลายพันธุ์ (กิตติกร, 2546) พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2 มก./ล. แคลลัสมีการแบ่งตัวไม่เกิดสีดำและเกิดจุดเขียวแต่แคลลัสที่เกิดจุดเขียวไม่มีการพัฒนาเป็นต้นหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ทำให้แคลลัสเกิดจุดเขียว (ภาพที่ 28) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน มีการพัฒนาเป็นต้นได้ถึง 76.19% (ภาพที่ 29) จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่เตรียมจากอาหารที่มีโพรีนอาจทำให้ได้ embryogenic callus มากขึ้น ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Hsia และคณะ (1998) ที่ได้ชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ Taichung native 1 แล้วพบว่าโพรีนส่งเสริมการเกิด embryogenic callus ที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีเมื่อเทียบกับไม่มีการเติมโพรีน



ภาพที่ 28 ลักษณะแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์



ภาพที่ 29 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล.

- ก. แคลลัสที่เกิดจุดเขียว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์
- ข. แคลลัสที่มีการพัฒนาไปเป็นต้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน
- ค. ต้นข้าวที่เลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน เกิดรากและยอดที่สมบูรณ์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน

ถึงแม้ว่าการใช้ฮอร์โมน NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ทำให้แคลลัสมีการพัฒนาเป็นต้นได้มาก แต่ต้องใช้เวลาจนถึง 2 เดือนจึงจะได้ต้นจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองลดความเข้มข้นของ NAA ลงเพื่อที่จะทำให้เกิดยอดและต้นได้เร็วขึ้น โดยทดลองย้ายแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. และโพรีลีน 2.88 ก./ล. เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาทำการชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณ NAA 0.1 และ 0.5 มก./ล.

ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน พบว่าในทุกสภาวะทำให้แคลลัสเกิดจุดเขียวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) อาหารที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ทำให้มีการเกิดต้นได้สูงที่สุดถึง 83.33 % โดยมียอดและรากที่สมบูรณ์แต่แคลลัสมีการแบ่งตัวน้อย การเกิดต้นรองลงมาคืออาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ทำให้มีการเกิดต้นได้ 58.33% โดยต้นมียอดและรากที่สมบูรณ์และยังพบแคลลัสที่กำลังพัฒนาไปเป็นยอดอีกจำนวนมาก ส่วนอาหารที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ระยะเวลา 30 วันยังไม่มีต้นเกิดขึ้นแต่แคลลัสมีการแบ่งตัวมากและมีแคลลัสที่กำลังพัฒนาไปเป็นยอดจำนวนมาก (ภาพที่ 30 และ 31) เมื่อพิจารณาต้นที่เกิดขึ้นพบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. มีความแข็งแรงและมีรากมากกว่าต้นที่ได้จากอาหารที่เติม NAA 0.5 และ 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. (ภาพที่ 32)

ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นในข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 เพราะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้นประมาณ 30 วัน ส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ถึงแม้ว่าพบแคลลัสที่กำลังพัฒนาไปเป็นยอดจำนวนมากนั้น แต่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 2 เดือนจึงจะได้ต้นจำนวนมาก ซึ่งอาจทำให้เกิด somaclonal variation ได้ (Hiei *et.al.*, 1997)

ตารางที่ 13 อิทธิพลของ NAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. ต่อการชักนำให้แคลลัสเกิดต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

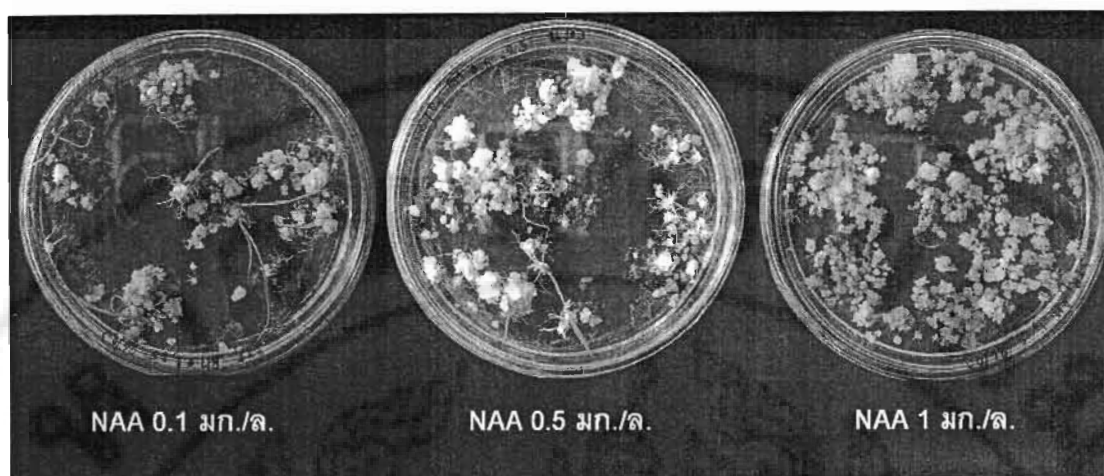
ความเข้มข้น ของ NAA (มก./ล.)	ความ เข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวน แคลลัส ทั้งหมด	จำนวน แคลลัสที่ เกิดจุด เขียว	จำนวนต้น ที่เกิดขึ้น	เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ เกิดจุดเขียว ^a	เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ เกิดต้น ^b
0.1	2.5	12	12	10	100	83.33
0.5	2.5	12	12	7	100	58.33
1.0	2.5	12	12	0 ^c	100	0.00

หมายเหตุ

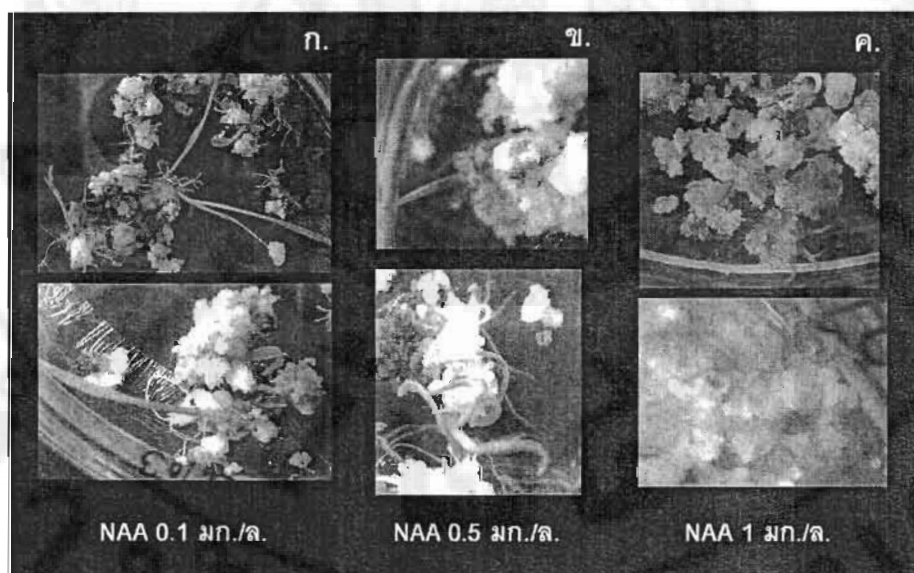
a ; เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดจุดเขียว = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) x 100

b ; เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น = (จำนวนต้น / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) x 100

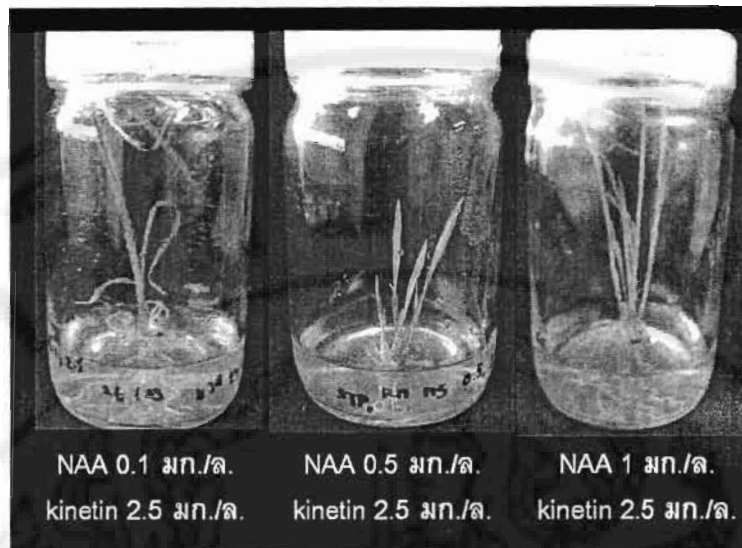
c ; แคลลัสจำนวนมากกำลังพัฒนาเป็นยอด



ภาพที่ 30 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 31 ลักษณะแคลลัสที่กำลังพัฒนาเป็นยอดและต้นอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน
 ก. แคลลัสที่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์
 ข. แคลลัสที่กำลังพัฒนาไปเป็นยอดและราก
 ค. แคลลัสที่กำลังพัฒนาเป็นยอด



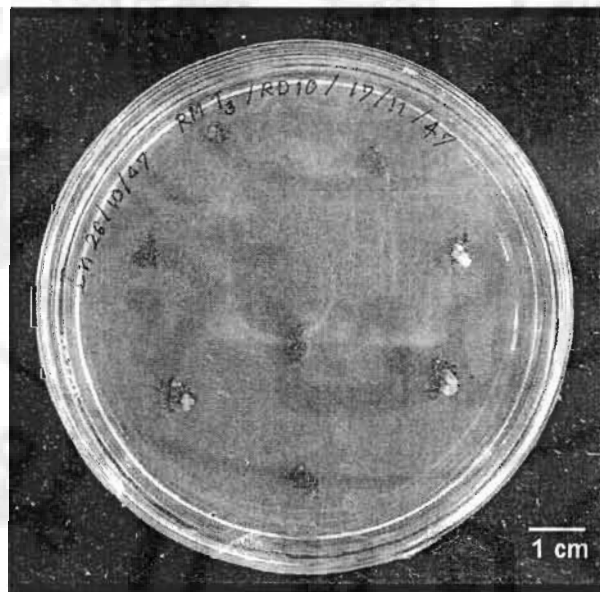
ภาพที่ 32 ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA ระดับความเข้มข้น
ต่างๆ ร่วมกับ kinetin 2.5 มก./ล.

การชักนำแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 10 ให้พัฒนาเป็นต้น

เมื่อนำแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ โพรลีน 2.88 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA 0.0, 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทั้ง 3 ทรีตเมนต์ แคลลัสทุกกลุ่มที่วางลงไปไม่มีการขยายขนาด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบการเปลี่ยนสีของแคลลัสจากสีเหลืองเป็นสีดำและแห้งตายในที่สุด (ภาพที่ 33)

นอกจากนั้นยังได้นำแคลลัสมาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ IAA และ BA 0 ไมโครโมลาร์, IAA 2.5 และ BA 18 ไมโครโมลาร์, IAA 2.5 และ BA 25 ไมโครโมลาร์ และ IAA 5 และ BA 18 ไมโครโมลาร์ พบว่าแคลลัสเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีดำและแห้งตายในที่สุด เช่นเดียวกันกับการทดลองข้างต้น (ไม่ได้แสดงผล)

การที่แคลลัสมีลักษณะสีดำ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ ออกซินและไซโทไคนินที่ไม่เหมาะสม จึงต้องมีการศึกษาและปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นต่อไป หรืออาจต้องมีการเติมสารอินทรีย์ ชนิดอื่น ๆ เช่น ทริปโตเฟน กลูตามีน สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (ประภาและพรทิพย์,2537) เพื่อช่วยให้แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 10 พัฒนาเป็นต้น



ภาพที่ 33 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 10 ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การถ่ายยีน

การถ่ายยีนในเซลล์ของข้าวเหนียวสันป่าตอง

ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกราไมซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกเซลล์

ในขั้นตอนการถ่ายยีน จะต้องทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนออกจากเซลล์ที่ไม่ได้รับยีน โดยอาศัยคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะของเซลล์ที่ได้รับยีน ดังนั้น จึงได้ทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีน

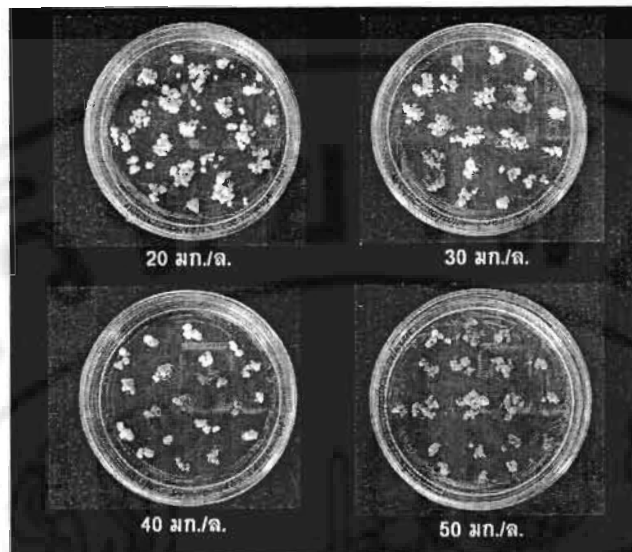
เมื่อย้ายเซลล์ของข้าวเหนียวสันป่าตองที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาทดสอบหาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกราไมซิน โดยนำมาวางบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของไฮโกราไมซินต่างๆ กัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ไฮโกราไมซินที่มีความเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับยีนไม่เจริญเติบโตถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้คัดเลือกเซลล์ของข้าวเหนียวสันป่าตองที่ได้รับยีนและต้านทานต่อยาไฮโกราไมซิน (ตารางที่ 14 และภาพที่ 34) เซลล์ของข้าวเหนียวสันป่าตอง สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกราไมซินได้ในระดับที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ซึ่งยาไฮโกราไมซินที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีน คือ 15 มก./ล. (ช่อทิพา และคณะ, 2548) และ 30 มก./ล. (Sakulsingharoj *et al.*, 2004) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าข้าวแต่ละพันธุ์ทนต่อระดับยาต่างๆ กัน ในการศึกษาการถ่ายยีน ควรศึกษาความเหมาะสมของระดับยาปฏิชีวนะ ก่อนที่จะทำการถ่ายยีน

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นของยาไฮโกราไมซินที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ของข้าวเหนียวสันป่าตอง

ความเข้มข้นของยาไฮโกราไมซิน (มก./ล.)	จำนวน เซลล์เริ่มต้น	จำนวนเซลล์ ที่เจริญได้	เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ เจริญได้บนอาหาร คัดเลือก ¹
20	61	54	88.61 ^a
30	61	47	77.05 ^{ab}
40	59	41	69.49 ^b
50	48	4	8.33 ^c
F-test			**
CV(%)			10.30

หมายเหตุ

** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT)



ภาพที่ 34 ลักษณะแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่างๆ กัน

การถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย โดยวิธีที่
ดัดแปลงจาก Toki (1997)

หลังจากเตรียมแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อนและมีลักษณะกลม แน่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มม. และเชื้ออโกรแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร AB (ภาพที่ 35 ก. และ ข.) นำแคลลัสมาแช่ร่วมกับสารละลายอโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1303 โดยใช้เวลาต่างๆ กัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน (ภาพที่ 35 ค.) จึงล้างแคลลัสและนำไปวางบนอาหารคัดเลือก พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสม คือ 3 นาที โดยทำให้เกิดแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินสูงที่สุดคือ 40.38 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 35 ง.) เนื่องจากการใช้เวลา 5 และ 10 นาที อาจทำให้แคลลัสได้รับเชื้อ *Agrobacterium* ในปริมาณที่มากเกินไปทำให้แคลลัสแบ่งตัวได้ไม่ดี และแคลลัสจะมีลักษณะฉ่ำน้ำ ซึ่งไม่เหมาะแก่การนำไปชักนำให้เกิดขึ้น

จากการทดลองวิธีการถ่ายยีน โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Toki (1997) พบว่าแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ อาจเนื่องจากว่าวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) เป็นการทดลองในข้าว *japonica* ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมกับข้าวเหนียวไทย อีกทั้งสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้นตามสูตรของ Toki (1997) ไม่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองเจริญเป็นต้นได้

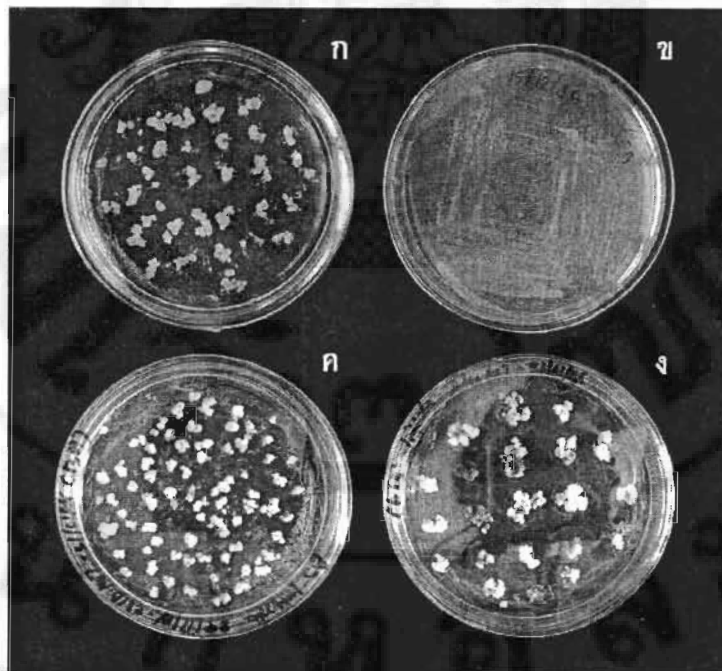
ตารางที่ 15 อิทธิพลของระยะเวลาการแช่แคลลัสร่วมกับสารละลาย *Agrobacterium*
(infection time) ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (ดัดแปลงจาก Toki,1997)

ช่วงเวลาที่ใช้แช่แคลลัส ร่วมกับอโกรแบคทีเรีย (นาทีก)	จำนวนแคลลัส เริ่มต้น	จำนวนแคลลัสที่เจริญ ได้นบนอาหารคัดเลือก	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ ต้านยาไฮโกรมัยซิน ^a
1.50	138	48	34.78 ^b
3.00	104	42	40.38 ^a
5.00	138	35	25.36 ^c
10.00	108	22	20.37 ^d
F-test			*
CV(%)			8.29

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT

a ; เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน = (จำนวนแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือก / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) $\times 100$



ภาพที่ 35

การถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง

ก. แคลลัสที่เตรียมสำหรับการถ่ายยีน

ข. อโกรแบคทีเรียบนอาหารสูตร AB

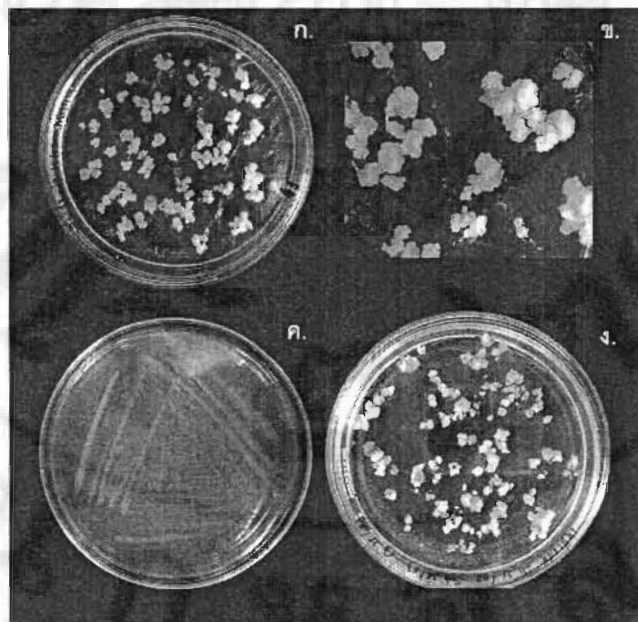
ค. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงร่วมกับอโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 3 วัน

ง. แคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ผลของ acetosyringone ที่มีต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง

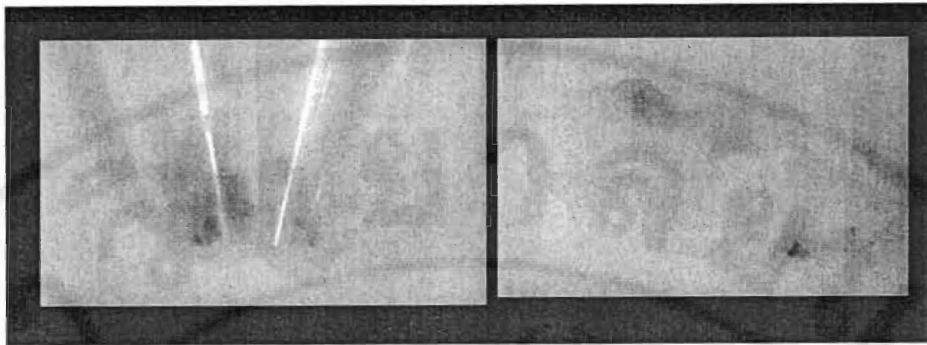
ในการศึกษาการถ่ายยีนของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ได้ทำการศึกษาหาปริมาณ acetosyringone ที่เหมาะสมในการแช่แคลลัสร่วมกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย โดยได้ทำการทดลองแบ่งเป็น 2 ตอนดังนี้

ในการทดลองครั้งแรกได้ทำการถ่ายยีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Toki (1997) โดยเตรียมแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองที่มีลักษณะกลม แน่น สีเหลืองอ่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร และเชื้ออโกรแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร AB (ภาพที่ 36) นำแคลลัสมาแช่ร่วมกับสารละลายอโกรแบคทีเรีย (pCambia 1303) ที่เติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จึงล้างแคลลัสแล้วนำไปทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS assay พบว่าแคลลัสที่สุ่มมาทดสอบสามารถเปลี่ยนสาร X-gluc ให้เป็นสารสีฟ้า (ภาพที่ 37) แสดงว่าแคลลัสได้รับยีน *gus* จากนั้นนำแคลลัสไปวางบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. และไทเมนทิน 150 มก./ล. (ภาพที่ 38) พบว่าเกิดแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน 26.67% แล้วจึงย้ายแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินมาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 2 มก./ล. (บุรณศักดิ์, 2547) พบว่าแคลลัสไม่มีจุดเขี้ยวเกิดขึ้น



ภาพที่ 36 การถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง

- ก. แคลลัสที่ทำการ subculture เป็นเวลา 3 วัน
- ข. แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองที่มีลักษณะกลม แน่น สีเหลืองอ่อน
- ค. เชื้ออโกรแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร AB เป็นเวลา 3 วัน
- ง. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 37 แคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อใช้ acetosyringone 50 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีน



ภาพที่ 38 แคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. เป็นเวลา 14 วันเมื่อใช้ acetosyringone 50 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีน

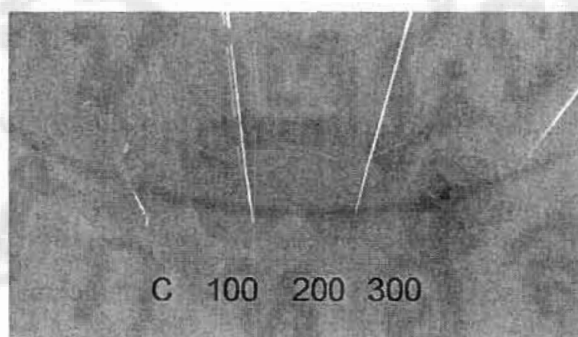
ถึงแม้ว่าการใช้ acetosyringone 50 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีนจะพบการแสดงของยีน *gus* แต่จากรายงานของ Saharan และคณะ (2004 b) พบว่าการใช้ acetosyringone ความเข้มข้นสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในข้าว *indica* พันธุ์ HKR-46 และ HKR-126 ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการถ่ายยีนโดยนำแคลลัสมาแช่ร่วมกับสารละลายยอโกรแบคทีเรีย

(pCAMBIA 1303) ที่เติม acetosyringone ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จึงล้างแคลลัส แล้วนำไปทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS assay พบว่าแคลลัสที่สุ่มมาทดสอบสามารถเปลี่ยนสาร X-gluc ให้เป็นสารสีฟ้า (ภาพที่ 39 และ 40) และเมื่อนำไปวางบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 41) พบว่าการแช่แคลลัสในสารละลายไฮโกรแบคทีเรียที่เติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินสูงที่สุดคือ 50.00. % รองลงมาคือ แช่แคลลัสในสารละลายไฮโกรแบคทีเรียที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ และ 300 ไมโครโมลาร์ พบแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน 40.00 % และ 38.09% ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

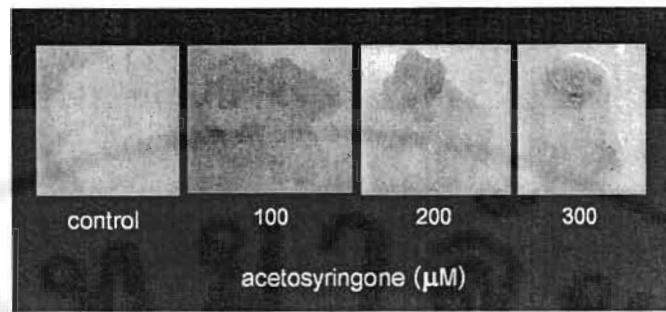
ตารางที่ 16 อิทธิพลของ acetosyringone ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกประมาณ 14 วัน

ความเข้มข้นของ acetosyringone (ไมโครโมลาร์)	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	จำนวนแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน ^a
100	22	11	50.00
200	20	8	40.00
300	21	8	38.09

หมายเหตุ a ; เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน = (จำนวนแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือก / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) × 100



ภาพที่ 39 แคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีน



ภาพที่ 40 ลักษณะแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อใช้ acetosyringone ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในการถ่ายยีน



ภาพที่ 41 แคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มก./ล. เป็นเวลา 14 วันเมื่อใช้ acetosyringone ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการถ่ายยีน

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส พบว่าการแช่แคลลัสในสารละลายไฮโกรมัยซินที่เตรียมที่เดิม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดแคลลัสที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสสูงที่สุด ดังนั้น acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการถ่ายยีนของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง

การถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย โดยวิธีที่
ดัดแปลงจาก Pipatpanukul และคณะ (2004)

หลังจากที่ได้ทำการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยวิธีดัดแปลงจาก Toki (1997) พบว่าแคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซินไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ จึงได้ทำการทดลองหาระบบที่เหมาะสมในการถ่ายยีนอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งดัดแปลงจาก Pipatpanukul และคณะ (2004) พบว่าในขั้นตอนการถ่ายยีนระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้แช่แคลลัสร่วมกับเชื้ออโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมที่สุดคือ 15 นาที เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 42)

จากการทดลองได้นำแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกัน เป็นเวลา 3 วันมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าแคลลัสเกิดเป็นสีฟ้า ทั้ง 3 ช่วงเวลาที่ใช้ในการถ่ายยีน คือ 5, 10 และ 15 นาที (ภาพที่ 43) แสดงว่าแคลลัสได้รับยีนที่ถ่ายเข้าไปได้

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ได้สุ่มแคลลัสมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าแคลลัสสามารถเกิดสีฟ้า เฉพาะแคลลัสที่ใช้ระยะเวลาในการแช่แคลลัสร่วมกับอโกรแบคทีเรีย 15 นาทีเท่านั้น (ไม่ได้แสดงผล) ส่วน 5 และ 10 นาที ไม่พบสีฟ้า เนื่องจากว่าการสุ่มแคลลัสอาจจะไม่ได้เลือกแคลลัสกลุ่มที่ได้รับยีนมาทดสอบ

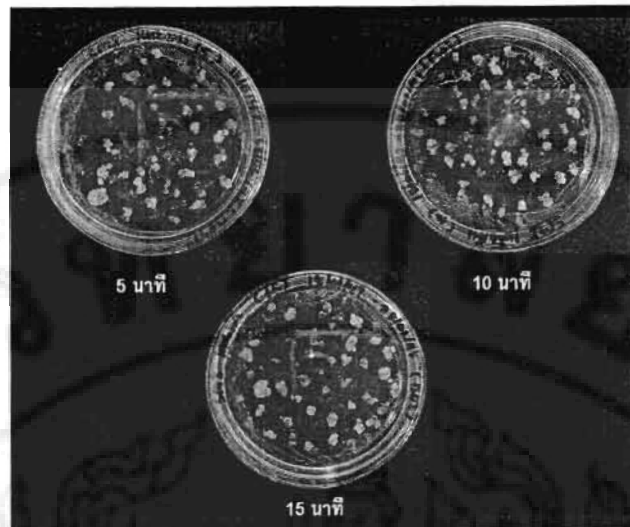
ตารางที่ 17 อิทธิพลของระยะเวลาการแช่แคลลัสร่วมกับสารละลาย *Agrobacterium* (infection time) ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (ดัดแปลงจาก Pipatpanukul et.al., 2004)

ช่วงเวลาที่ใช้ ในการถ่ายยีน (นาที)	จำนวนแคลลัส เริ่มต้น	จำนวนแคลลัสที่ ด้านยาไฮโกรมัยซิน	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญ ได้บนอาหารคัดเลือก ^a
5.00	99	32	32.32 ^b
10.00	52	26	50.00 ^a
15.00	46	25	54.37 ^a
	F-test		*
	CV(%)		7.44

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT

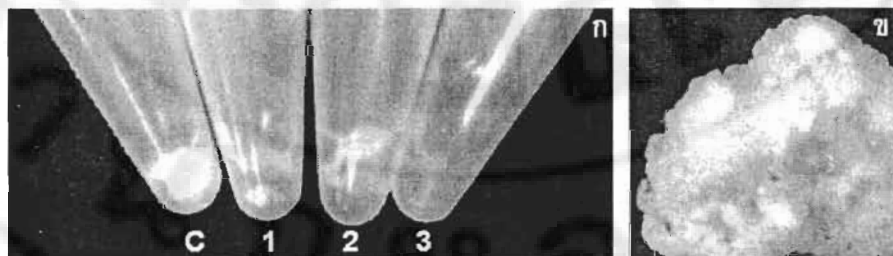
a ; เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญได้ = (จำนวนแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือก / จำนวนแคลลัสทั้งหมด) × 100



ภาพที่ 42 ลักษณะของแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมายซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากผ่านการถ่ายยีนที่ใช้ช่วงเวลาในการแช่แคลลัสต่างๆ กัน

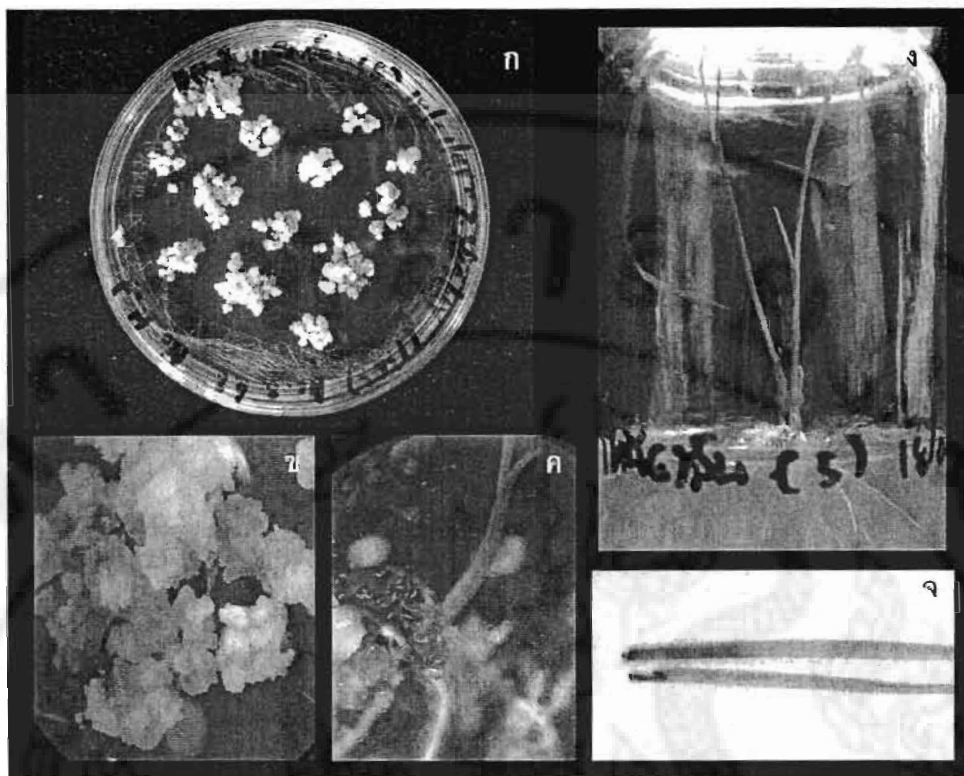
เมื่อนำแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมายซินมาชักนำให้เกิดต้นลงบนอาหารสูตร MS 2 สูตร เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน กับที่เติม NAA 0.2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล. พบว่าแคลลัสที่ย้ายลงอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนสามารถเกิดจุดเขียวได้เท่านั้น แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ (ไม่ได้แสดงผล)

ส่วนแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล. พบว่า หลังจาก 2 สัปดาห์ แคลลัสเกิดเป็นจุดเขียว และมีการพัฒนาเป็นยอดและรากที่สมบูรณ์ และ เกิดต้นข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรมได้ (ภาพที่ 44) และเมื่อนำใบของต้นข้าวเหนียวสันป่าตอง ดัดแปลงพันธุกรรมมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าใบข้าวเหนียวสันป่าตองเกิดเป็น สีฟ้า (ภาพที่ 44 ง.)



ภาพที่ 43 แคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงร่วม 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *gus*

ก. c คือ แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 1, 2 และ 3 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนโดยใช้ ช่วงเวลาในการแช่แคลลัสร่วมกับไฮโกรแบคทีเรีย 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ
ข. ลักษณะแคลลัสที่ถ่ายยีนโดยใช้ช่วงเวลาในการแช่แคลลัสร่วมกับไฮโกรแบคทีเรีย นาน 15 นาที (ภาพถ่ายภายใต้กล้อง stereo)

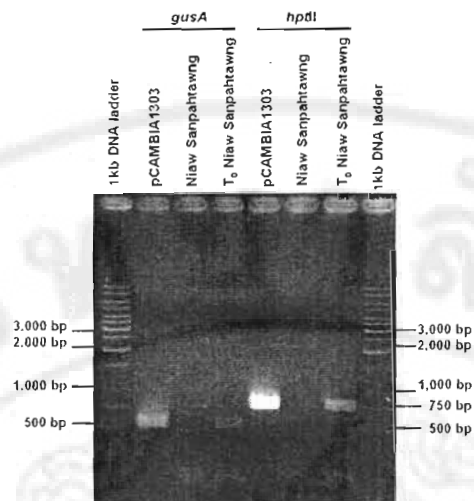


ภาพที่ 44 การพัฒนาเป็นต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม
 ก. แคลลัสเกิดเป็นจุดเขียวหลังเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นเป็นเวลา 2 สัปดาห์
 ข. และ ค. แคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินกำลังพัฒนาเป็นต้น
 ง. ต้นอ่อนที่เจริญบนอาหารมีการพัฒนารากและยอดที่สมบูรณ์
 จ. ใบข้าวเหนียวสันป่าตองมีการแสดงออกของยีน *gus*

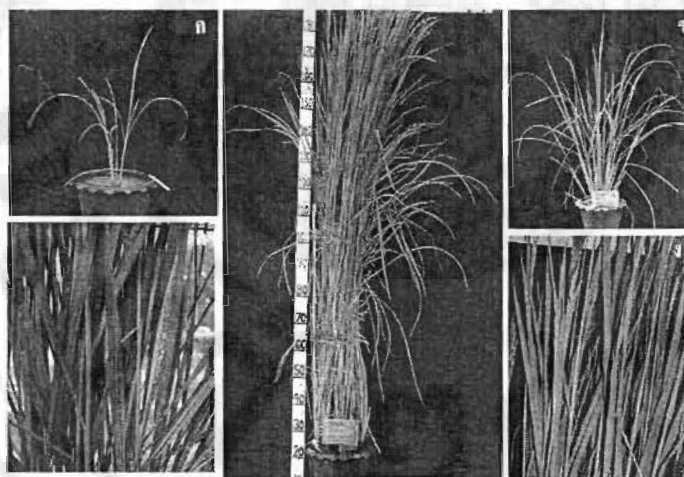
การแทรกของยีน *gusA* และ *hptII* ในจีโนมข้าว

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของข้าวเหนียวสันป่าตองมาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์ตามที่คาดหมายไว้ แสดงว่า มีการแทรกของยีน *gusA* และ *hptII* ในจีโนมของข้าวเหนียวสันป่าตอง (ภาพที่ 45)

ต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรมที่เจริญในโรงเรือน มีความสูงประมาณ 2 เมตร แต่เมล็ดที่เกิดขึ้นมีลักษณะลีบ ฝ่อ (ภาพที่ 46) ไม่สามารถนำไปทดสอบขั้นต่อไปได้ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากวิธีการส่งถ่ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียทำให้เกิดการแทรกของยีนในจีโนมพืชแบบสุ่ม ซึ่งอาจไปมีผลต่อการสร้างเมล็ดของข้าวเหนียว



ภาพที่ 45 ผลการตรวจสอบยีน *gusA* และ *hptII* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งคาดหวังแถบดีเอ็นเอที่ 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ โดย pCambia1303 ใช้เป็น positive control, Niaw Sanpahtawng เป็น negative control, T₀ Niaw Sanpahtawng เป็นตัวอย่างจากต้นข้าวเหนียวสันป่าตองที่มีการแสดงออกของยีน *gusA*



ภาพที่ 46 ลักษณะของต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม อายุ 1 เดือน (ก), 2 เดือน (ข), ตั้งท้อง (ค) และออกรวง (ง) ที่เจริญในโรงเรือน

การถ่ายยีนในข้าวเหนียวข 6

ปริมาณยาไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ไม่ได้ทำการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก ที่มีความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินต่าง ๆ กันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่มีการเติมไฮโกรมัยซินเพิ่มขึ้นจนถึง 15 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 18) ดังนั้นความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นระดับที่ต่ำสุดที่สามารถใช้ในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน ในขณะที่ Pipatpanukul และคณะ (2004) ได้รายงานไว้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จากการทดลองนี้ยังพบว่าแคลลัสบางส่วนที่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 18 ปริมาณยาไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ข 6 ที่ได้รับยีน

ปริมาณไฮโกรมัยซิน(มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่ตาย*	เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เจริญได้*
0	8.33 ^c	91.67 ^a
10	70.83 ^b	29.17 ^b
15	100.00 ^a	0.00 ^c
20	100.00 ^a	0.00 ^c
30	100.00 ^a	0.00 ^c
F - test	*	*

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

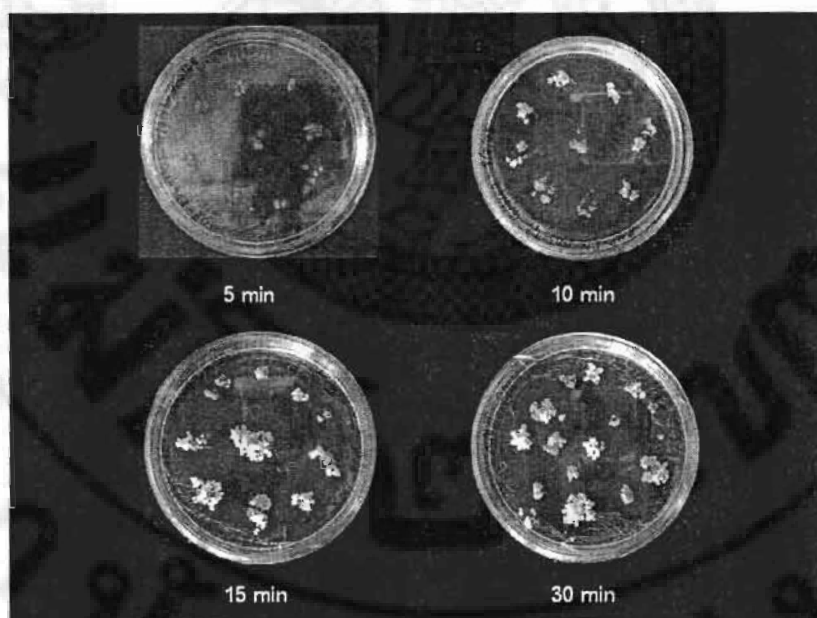
เมื่อทำการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL - 1 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1303 โดยมีระยะเวลาในการแช่แคลลัสในสารละลายของเชื้ออโกรแบคทีเรีย (Infection time) 5, 10, 15 และ 30 นาที พบว่า เมื่อสุ่มแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันมาทดสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ β - glucuronidase จะพบการแสดงออกของยีน (ไม่ได้แสดงผล) ในทุกระยะเวลาที่แช่แคลลัสกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย จากนั้นจึงทำการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มียาไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในการแช่แคลลัสกับเชื้ออโกรแบคทีเรียมานาน 30 นาที มีแคลลัสที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกมากที่สุด เท่ากับ 88.89 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 15, 10 และ 5 นาที โดยมีแคลลัสที่สามารถเจริญได้เท่ากับ 66.67, 44.44 และ 8.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 19;

ภาพที่ 47) โดยระยะเวลาในการแช่แคลลัสในสารละลายของเชื้ออโกรแบคทีเรีย สอดคล้องกับการทดลองของ Pipatpanukul และคณะ (2004)

ตารางที่ 19 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

ระยะเวลาในการแช่แคลลัส ร่วมกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย (นาทีก)	เปอร์เซ็นต์ของ แคลลัสที่ตาย*	เปอร์เซ็นต์ของ แคลลัสที่เจริญได้*
5	91.67 ^a	8.33 ^c
10	55.56 ^b	44.44 ^b
15	33.33 ^{bc}	66.67 ^{ab}
30	11.11 ^d	88.89 ^a
F - test	*	*

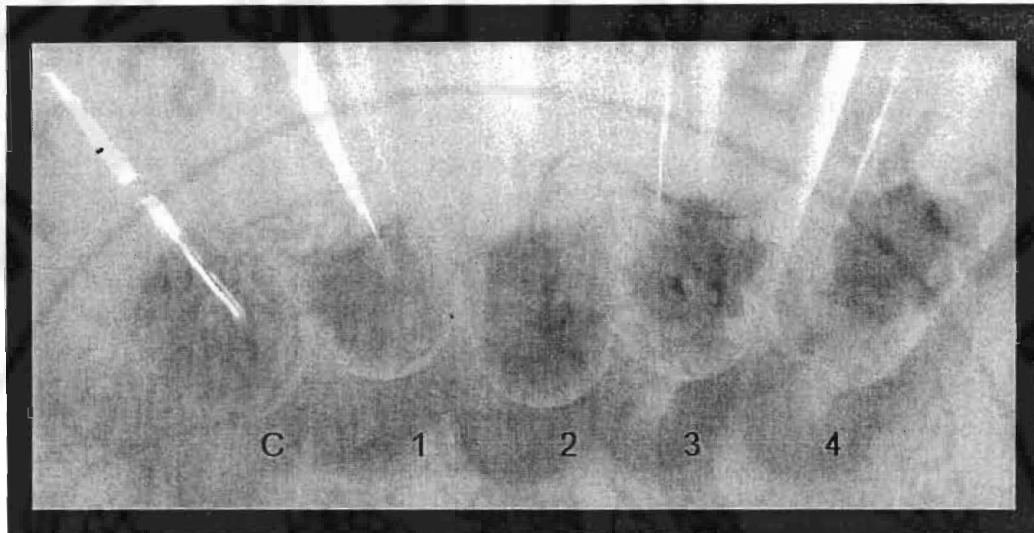
หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี LSD



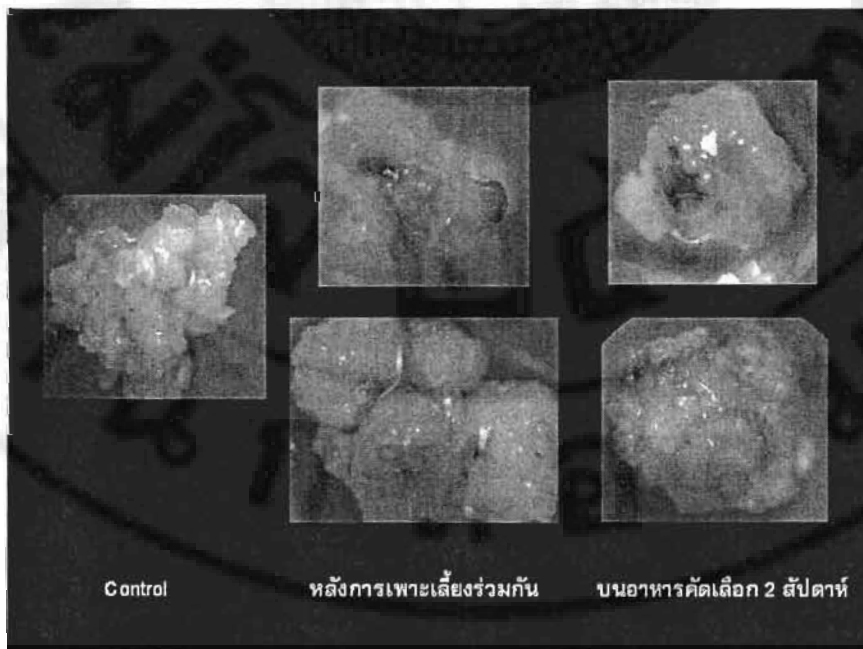
ภาพที่ 47 การเจริญของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกหลังการถ่ายยีนที่ระยะเวลาด่าง ๆ

หลังจากทำการถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยแช่แคลลัสร่วมกับเชื้ออโกรแบคทีเรียเป็นเวลานาน 30 นาที แล้วเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลานาน 3 วัน แล้วเมื่อนำแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย มาตรวจสอบด้วยวิธี GUS Assay พบว่าเกิดสารสีฟ้า แสดงว่ามีการถ่ายยีนจากเชื้ออโกรแบคทีเรียเข้าไปสู่เซลล์ของแคลลัส

นอกจากนี้ ยังพบว่ามีแคลลัสสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อนำแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินมาทดสอบด้วยวิธี GUS Assay พบว่าเกิดสารสีฟ้าเช่นกัน แสดงว่ายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในเซลล์ของแคลลัสนั้นคงอยู่ภายในแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ภาพที่ 48 และ 49)

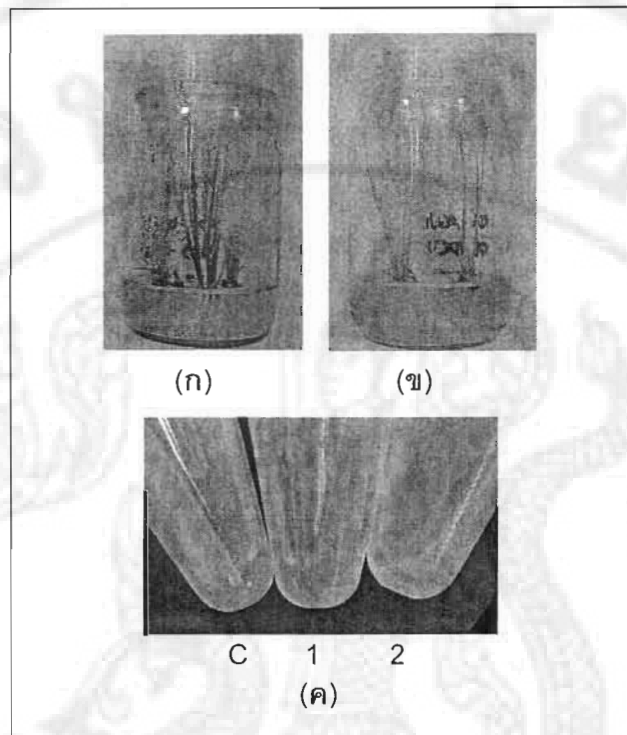


ภาพที่ 48 การตรวจสอบการได้รับยีนด้วยวิธี GUS Assay โดย C คือ แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 1) และ 2) คือ แคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกัน 3) และ 4) คือ แคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกนาน 14 วัน



ภาพที่ 49 ลักษณะแคลลัสที่เกิดสารสีฟ้าภายหลังการทดสอบด้วยวิธี GUS Assay

หลังจากได้ต้นข้าวที่ต้านทานยาไฮโดรเมทิลทั้งหมด 10 ต้น จึงนำไปจากต้นข้าวมาทดสอบ Gus Assay พบว่า ใบจากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนไม่เกิดสีฟ้า แสดงว่า ต้นข้าวที่นำมาทดสอบไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* (ภาพที่ 50)



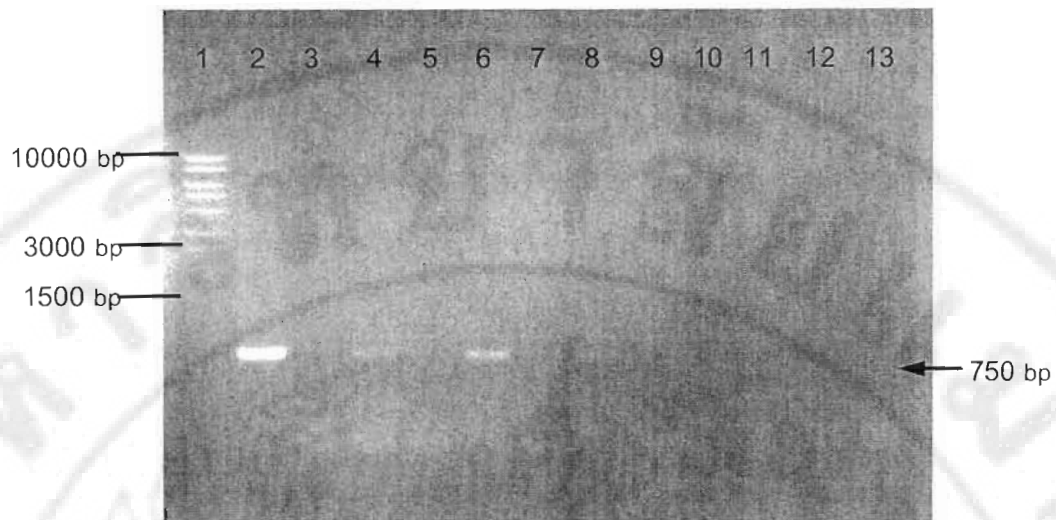
ภาพที่ 50 การทดสอบใบของต้นข้าวที่ต้านยาไฮโดรเมทิล

ก) และ ข) คือ ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนจากเชื้ออโกรแบคทีเรีย

ค.) คือ ลักษณะใบข้าวที่ทดสอบโดยวิธี Gus Assay โดยที่ C คือ ใบของต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 1) และ 2) คือ ใบของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเชื้ออโกรแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวมาเพิ่มปริมาณขึ้นยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII* และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis พบว่า lane 4, 6, 7, 8, 9 และ 11 ให้แถบดีเอ็นเอตรงกับแถบดีเอ็นเอของ lane 2 ซึ่งเป็นพลาสมิด pCAMBIA1303 ที่มียีน *hptII* (positive control) โดยมีขนาด 750 bp และ lane 3 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอจากต้นข้าว กข 6 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) ไม่พบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหมาย แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นข้าวที่ให้ผล *gus* negative แต่ต้านทานยาไฮโดรเมทิล 6 ต้นนี้ มียีน *hptII* แทรกอยู่ในจีโนมของข้าว ส่วนต้นข้าวอีก 4 ต้น ไม่มียีน *hptII* แต่สามารถต้านทานยา ไฮโดรเมทิลได้ อาจเนื่องมาจากยาไฮโดรเมทิลมีความเข้มข้นน้อยเกินไป ทำให้ต้นข้าวรอดตายจากยาได้ (escape) (ภาพที่ 51)



ภาพที่ 51 การตรวจสอบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII* ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis ที่ใช้ 1X TAE buffer ทำที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที ใช้ผลผลิต PCR lane 2 ปริมาตร 5 μ l และ lane 3-13 ปริมาตร 15 μ l โดย Lane 1 : Marker MassRuler DNA Ladder (Fermentas), Lane 2 : p1303 (positive control), Lane 3: กข 6 (negative control), Lane 4-13 : ต้นที่ 1-10 ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

ข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ สามารถเกิดแคลลัสได้โดยโพรงมีผลทำให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะดีมีการแบ่งตัวสูงเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่เติม 2,4-D ที่เหมาะสม แคลลัสของข้าวเหนียวเกือบทุกพันธุ์ที่ทำการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และไคเนตินที่เหมาะสมสามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ จากผลการทดลองทำให้ได้ระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัส และการชักนำให้เกิดต้นข้าวเหนียว และนำระบบที่ได้มาใช้ในการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง และกข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

การถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง และกข 6 พบว่า ได้แคลลัสที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และมีการแสดงออกของยีน *gusA* แคลลัสที่ได้รับยีนมีการพัฒนาเป็นจุดสีเขียวและเกิดเป็นต้นข้าวได้ จากผลการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่า มีการแทรกของยีนเครื่องหมาย และยีนรายงานผลในจีโนมข้าว แสดงให้เห็นว่าสามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสและพัฒนาให้เกิดต้นข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไป

ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้จะสามารถสร้างข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรมได้ แต่อย่างไรก็ตามการถ่ายยีนในข้าวเหนียวซึ่งเป็นข้าวอินดิกายังคงมีประสิทธิภาพที่ต่ำ ดังนั้นควรต้องมีการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนและการชักนำให้เกิดต้นเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการได้ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมให้สูงมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2546. สถิติเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2544-45 เอกสารวิชาการ ข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. 2544. 150 หน้า.
- กิตติกร พงษ์พานิช. 2546. การเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวและการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.
- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2543. การศึกษาการถ่ายยีน α - factor จากยีสต์ เพื่อสร้างความต้านทานโรคใบไหม้ในข้าวโดยใช้เครื่องยิงโมเลกุล DNA. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, สุนทีย์ บุนนาค, ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์, มานิตย์ โฆษิตตระกูล และอนวัช สุวรรณกุล. 2548. การส่งถ่ายยีนโคทิเนสเข้าสู่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14 กรุงเทพฯ. 375-381.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, กิตติกร พงษ์พานิช, บุรณศักดิ์ เชื้อทอง และนลินี รุ่งเรืองศรี. 2547. การเพาะเลี้ยงแคลลัสและการถ่ายยีนของข้าวเหนียวไทย. รายงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 5. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 286-293.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, ณิชนน ธรรมรักษ์, พิษณุภา มหาสุข, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และนลินี รุ่งเรืองศรี. 2548. การถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6 19-20 พฤษภาคม 2548 มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- นิตยศรี แสงเดือน. 2536. พันธุวิศวกรรม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุรณศักดิ์ เชื้อทอง. 2547. การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.
- ประภา ศรีพิจิตร และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพพะของข้าวหอม (Oryza sativa L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย) 27-37.
- เผติม ระติสุนทร, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ พุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และเลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2536. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย) 28 : 27 - 37.

- มรกต ตันติเจริญ และ ศิริพร จำรัสเลิศลักษณ์.2547. เทคโนโลยีชีวภาพกับการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว.ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์กุล, สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, พัฒนา ศรีฟ้า และอมรา ทองปาน. 2543. การแสดงออกของยีน Chymotrypsin inhibitor ของถั่วพูในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 11.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 252 - 256.
- ศิริศักดิ์ เทพาคำ. 2547. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. Online. <http://rde.biotech.or.th/Tissue.pdf>.
- ศิริพร เหล่าเกิดพงษ์. 2527. เทคนิคการผสมพันธุ์พืชที่สำคัญบางชนิด. เชียงใหม่: สถาบันเทคโนโลยี การเกษตรแม่โจ้.เอกสารประกอบการสอนปฏิบัติการ วิชา ทพ.432.
- สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง. 2547ก. เอกสารแนะนำพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง. สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง, เชียงใหม่.
- สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง.2547ข.เอกสารแนะนำพันธุ์ข้าว กข 6. เอกสารเผยแพร่. สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง.เชียงใหม่.
- สถาบันวิจัยข้าว. 2546. ข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี 30 ปี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 230 น.
- สุพรรณฎิภา เสี่ยงสาย และประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ.2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอม 3 พันธุ์. เอกสารการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14.สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.กรุงเทพฯ .337-342.
- สุรางค์ศรี วาเพชร. 2537. การถ่ายทอดลักษณะพันธุ์เบา ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตจากการผสมพันธุ์ข้าวระหว่างจาโปนิก้า และอินดิก้า. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตเกษตรศาสตร์ (สาขาวิชาพืชไร่). เชียงใหม่. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.87 น.
- อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตยศรี แสงเดือน (2544). การถ่ายยีนในไมโครแคลล์ของข้าวไทยสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 การแสดงโปรตีนในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 150-154.
- อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2543. การย้ายและการแสดงออกของยีนในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 โดยอโครแบคทีเรีย. รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 11. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.210 - 214.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2540. ข้าว:พืชต้นแบบทางวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 10 : พันธุศาสตร์กับการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมไทย. 33 - 35.

- อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และธีรยุทธ ตูจินดา 2544. เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ใน “ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย” สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- อรอนงค์ นัยวิกุล.2547.ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.336 น.
- อารีย์ วรรณวิวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.โรงพิมพ์อติสรณ์ กรุงเทพฯ.133 หน้า.
- Amin A. M., Uddin A. M. and Hossain A. M..2004. Regeneration study of some indica rice cultivars followed by *Agrobacterium* – mediated transformation of highly regenerable cultivar, BR – 8.Journal of Biological Sciences. 4(2): 207 – 211.
- Burikam, S., P. Sripichitt, W. Kositratiana and S. Attathom.2002. Improved frequencies of Embryonic calli induction and plantlet regeneration in mature embryo of KDML 105, an Thai *indica* rice. Thai journal of Agricultural Science.35: 83-97.
- Chowdhry C., Tyagi A., Maheshwari N., Maheshwari S. 1993. Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). Plant Cell,Tissue and Organ Culture.32: 357-361
- George, E.F.1993.Plant propagation by tissue culture.Frome, Somerset: Exegetics Ltd. 1361 p.
- Hiei Y., Komari. T., Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Bio. 35:205-218.
- Hsia,C. and W. Changsheng.1998. Callus induction and shoot regeneration from mature seed of rice Tainung 67 (*Oryza sativa* L.). journal of Agricultural Research of China.47(4) : 338-345
- Hwang S.K. and Y.M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. J. Biochem. Mo. Biol. 33(6): 537-546.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep. 5:387-405.
- Kumria R, Rajam MV 2002. Alteration in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential. Plant Sci. 162: 769–777
- Mohanty A., Sarma N.P. and Tyagi AK. 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

- Moura, I. R. & Carneiro, M.F.N. 1997. Callus induction in leaf, inflorescence and embryo explants of *Howea forsteriana* (C. Moore & F. Muell.) Becc. *Broteria Gentica*, 18 (93): 31 - 37.
- Ozawa K., Kawahigashi H., Kayano T. and Ohkawa Y..2003. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by integration of the gene involved in regeneration ability of the callus. *Plant Sci.* 165:395-402.
- Pipatpanukul T, Bunnag S, Theerakulpisut P, Kosittrakul M. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songklanakarin J.Sci Technol.*26(1):1-13
- Ramesh S., Nagadhara D., Reddy V.D. and Rao K. V. 2004. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap – sucking insects, using super – binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.*166: 1077 -1085.
- Rashid H., Yokoi S., Toriyama K., Hinata K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant cell report.* 15:727-730.
- Rashid H, Bokhari SYA, Quraishi A. 2001. Callus induction ,Regeneration and hygromycin selection of rice (Super Basmati). *Online journal of biological sciences*1(12):1145-1146
- Saharan V., Yadav C. R., Yadav. R. N. and Chapagain P. B. 2004a. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). *African J. Biotechnology.* 3(5): 256 - 259.
- Saharan V, Yadav C.R., Yadav R.N. and Ram K. 2004b. Studies on improved *Agrobacterium*–mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza Sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 3(11):572-575
- Sakulsingharoj C., Choi S-B., Hwang S-K., Edwards G.E., Bork J., Meyer C.R., Preiss J., Okita T.W. 2004. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: The role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 167: 1323-1333.
- Shimamoto K. 1995. The molecular biology of rice. *Science* 270:1772-1773.
- Toki S. (1997). Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(1):16-21.
- Webster R. K. and P. S. Gunnell. 1992. *Compendium of rice Diseases*. St. Paul, Minn. : APS PRESS.62p.
- <http://www.cambia.org/daisy/cambia/materials/vectors/585.html>
- <http://www.doa.go.th/data-agri/ RICE/1stat/st04.html>

- Moura, I. R. & Carneiro, M.F.N. 1997. Callus induction in leaf, inflorescence and embryo explants of *Howea forsteriana* (C. Moore & F. Muell.) Becc. *Broteria Gentica*, 18 (93): 31 - 37.
- Ozawa K., Kawahigashi H., Kayano T. and Ohkawa Y..2003. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by integration of the gene involved in regeneration ability of the callus. *Plant Sci.* 165:395-402.
- Pipatpanukul T, Bunnag S, Theerakulpisut P, Kosittrakul M. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songklanakarin J.Sci Technol.*26(1):1-13
- Ramesh S., Nagadhara D., Reddy V.D. and Rao K. V. 2004. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap – sucking insects, using super – binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.*166: 1077 -1085.
- Rashid H., Yokoi S., Toriyama K., Hinata K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant cell report.* 15:727-730.
- Rashid H, Bokhari SYA, Quraishi A. 2001. Callus induction ,Regeneration and hygromycin selection of rice (Super Basmati). *Online journal of biological sciences*1(12):1145-1146
- Saharan V., Yadav C. R., Yadav. R. N. and Chapagain P. B. 2004a. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). *African J. Biotechnology.* 3(5): 256 - 259.
- Saharan V, Yadav C.R., Yadav R.N. and Ram K. 2004b. Studies on improved *Agrobacterium*–mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza Sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 3(11):572-575
- Sakulsingharoj C., Choi S-B., Hwang S-K., Edwards G.E., Bork J., Meyer C.R., Preiss J., Okita T.W. 2004. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: The role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 167: 1323-1333.
- Shimamoto K. 1995. The molecular biology of rice. *Science* 270:1772-1773.
- Toki S. (1997). Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(1):16-21.
- Webster R. K. and P. S. Gunnell. 1992. *Compendium of rice Diseases*. St. Paul, Minn. : APS PRESS.62p.
- <http://www.cambia.org/daisy/cambia/materials/vectors/585.html>
- <http://www.doa.go.th/data-agri/ RICE/1stat/st04.html>

<http://www.irri.org/about/faq.asp>

<http://pas.byu.edu/AgHrt100/rice.htm>

<http://www.riceweb.org/Plant.htm#morph>

<http://www.doa.go.th/index2.php>

