

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ผลของการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Horsch *et al.*, 1985 และ Ingrid, 2006)

เนื่องจากยาสูบและพืทูเนียเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่นิยมนำมาศึกษาการส่งถ่ายยีนและประสบความสำเร็จในการส่งถ่าย ดังนั้นการศึกษากครั้งนี้จึงได้ส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 ซึ่งมียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิดโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่า ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกได้ (ภาพ 4.1 และ 4.3) แสดงว่ายีน *nptII* ได้ถูกส่งเข้าไปในเนื้อเยื่อยาสูบและพืทูเนียและมีการแสดงออก เนื่องจาก ยีน *nptII* เป็นยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้จะสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกที่มีการเติมกานามัยซินได้ (Wilkinson and Davis, 1993) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical พบว่าเนื้อเยื่อยาสูบและพืทูเนียที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดเกิดสีฟ้า แสดงว่า ยีน *gus* ได้ถูกส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบและพืทูเนียและมีการแสดงออก เนื่องจากผลผลิตของยีน *gus* คือ β -glucuronidase ได้เปลี่ยนสารตั้งต้น x-gluc ให้เป็นสารสีฟ้า (Jefferson, 1987) ซึ่งเมื่อสังเกตจากตาเปล่าจะพบว่า การเกิดสีฟ้าของเนื้อเยื่อใบยาสูบและพืทูเนียที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART จะมีสีเข้มมากกว่าการส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pBI121 (ภาพ 4.2 และ 4.4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Francesca *et al.* (2007) เนื่องจากพลาสมิด pSTART เป็นพลาสมิดที่ดัดแปลงมาจากพลาสมิด pBI121 โดยการเติม poly CAA และ CT motif บริเวณ 5'UTR ที่อยู่บริเวณหน้ายีน *gus* ซึ่งจะทำให้ยีน *gus* มีการแสดงออกมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ยาสูบระหว่างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรีย LBA4404 และ EHA105 พบว่า ประสิทธิภาพการส่งถ่ายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1)ซึ่งขัดแย้งกับ Chen *et al.* (1996) ได้รายงานว่าสายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียมีผลต่อการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่พืช เนื่องจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์มีระดับความรุนแรงในการบุกรุกเข้าสู่พืชแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่พืทูเนียพบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.2) และการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 จะมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายมากกว่า

การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งสอดคล้องกับ Cao *et al.* (1998) ได้รายงานว่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนในบลูเบอร์รี่มากกว่าสายพันธุ์ LBA4404 เนื่องจากสายพันธุ์ EHA105 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการติดเชื้อ (super virulent) แต่อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ LBA4404 ก็ยังเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการส่งถ่ายยีน เนื่องจากสามารถกำจัดออกจากเนื้อเยื่อพืชได้ง่ายโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่ำๆ

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืชมุข ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ และประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดสูงที่สุดคือ 95 เปอร์เซ็นต์และ 97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

5.2 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวคิตาอิเกะ (kitaake) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Hiei *et al.*, 1994)

ข้าวคิตาอิเกะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นข้าวในกลุ่มजाโปนิกาซึ่งมีการศึกษาการส่งถ่ายยีนอย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงได้ทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิด โดยการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 ซึ่งมียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่แคลลัสข้าวคิตาอิเกะ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่า แคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดสามารถเจริญในอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซินได้ (ภาพ 4.5) แสดงว่า ยีน *nptII* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อกานามัยซินได้ถูกส่งเข้าไปในแคลลัสของข้าวคิตาอิเกะ (Wilmink and Dons, 1993)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical พบว่าแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดเกิดเป็นจุดสีฟ้า (ภาพ 4.6) แสดงว่ายีน *gus* ได้ถูกส่งถ่ายเข้าสู่แคลลัสและมีการแสดงออก เนื่องจากผลผลิตของยีน *gus* คือ β -glucuronidase ได้เปลี่ยนสารตั้งต้น x-gluc ให้เป็นสารสีฟ้า (Jefferson, 1987) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด พบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.3) และการส่งถ่าย EHA (pSTART) จะมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายสูงที่สุดเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งสูงกว่าการทดลองของ Terada *et al.* (2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการส่งถ่ายยีนในข้าวกลุ่มजाโปนิกาอีกหลายๆ สายพันธุ์ เช่น เช่น Fujisaka5 Tsukinohikari Asanohikari Koshihikari Taipei 309 และ Radon เป็นต้น (Aldemita and Hodges, 1996; Hiei *et al.*, 1997; Toki, 1997)

การทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการถ่ายยีนในข้าวกลุ่มจาโปนิกาอื่นๆ และข้าวในกลุ่มอินดิกาต่อไป

5.3 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ข้าวกลุ่มอินดิกาเป็นข้าวที่มีการศึกษาและรายงานการส่งถ่ายยีนค่อนข้างน้อยเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำได้ยาก ดังนั้น ได้นำข้าวบือโปะโละมาศึกษาการส่งถ่ายยีน โดยใช้เป็นตัวแทนของข้าวกลุ่มอินดิกา อีกทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาการส่งถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์นี้มาก่อน โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละ และทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอด รวมไปถึงการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

5.3.1 ผลการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ

จากการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ พบว่า กานามัยซินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เนื้อเยื่อปลายยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำและตายในที่สุด (ภาพ 4.7) ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีรายงานการทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ และยังไม่มีรายงานการส่งถ่ายพลาสมิดที่ใช้ยีน *nptII* ที่ต้านทานต่อกานามัยซินเป็นยีนคัดเลือกในเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าว โดยทั่วไปยีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยจะส่งผลให้พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น G418 และกานามัยซิน (Ayres and Park, 1994) มีรายงานการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้เพื่อคัดเลือกทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น อะราบิโดบซิส (Steven and Andrew, 1998) ข้าวโพด (Gould *et al.*, 1991) ฝ้าย (Zapata *et al.*, 1999) และข้าว (Dowla *et al.*, 2008) จากการทดลอง พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละไม่สามารถเจริญในอาหารที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากยาปฏิชีวนะในกลุ่มของอะมิโนไกลโคไซด์จะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ โดยที่กานามัยซินจะไปเกาะกับไรโบโซม 30S หน่วยเล็กทำให้ยับยั้งการแปลรหัสเป็นโปรตีนซึ่งส่งผลให้พืชแสดงลักษณะเป็นสีขาวเพราะไม่

สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และพืชก็จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (Wilmink and Jons, 1993) จากการทดลองของ Bourque *et al.* (1976) พบว่า กานามัยซินมีผลไปยับยั้งการทำงานของไรโบโซมในคลอโรพลาสต์ของถั่วพริ้วเมล็ดยาว (jack bean) โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ส่งผลทำให้การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง 40-70 เปอร์เซ็นต์และคลอโรพลาสต์หยุดการพัฒนา

5.3.2 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

จากการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่า เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด สามารถเจริญในอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ (จากการทดลองที่ 4.4.1) (ภาพ 4.8) และเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละสามารถเจริญเติบโตเป็นยอดใหม่หลายๆ ยอดได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) (อาหารสูตร MS-TDZ-S, ภาคผนวก ข) เนื่องจาก TDZ เป็นฮอร์โมนในกลุ่มของไซโตไคนินซึ่งสามารถชักนำให้พืชเจริญได้หลายๆ ยอด (Gairi and Rashid 2004; Goldman *et al.* 2003; Srivatanakul *et al.* 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yookongkaew *et al.* (2007) โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การใช้ TDZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวให้เจริญเป็นยอดหลายๆ ยอดได้

ผลการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ พบว่า เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่อยู่ในอาหารคัดเลือกจะมีลักษณะเป็นต้นสีขาว (albino) (ภาพ 4.8) เนื่องจากกานามัยซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ โดยไปเกาะกับไรโบโซม 30S หน่วยเล็ก ทำให้ยับยั้งการแปลรหัสเป็นโปรตีนซึ่งส่งผลให้ต้นข้าวเป็นต้นสีขาวเพราะไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ได้ (Wilmink and Jons, 1993) จากการศึกษาการขนส่งกานามัยซินในเนื้อเยื่อของพืช พบว่ากานามัยซินไม่ได้เคลื่อนที่ในเนื้อเยื่อลำเลียงแต่จะแพร่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งพบว่าจะมีการเคลื่อนที่แค่ระยะทางสั้นๆ (Weide *et al.*, 1989) ถ้าชิ้นส่วนพืชขนาดใหญ่จะทำให้กานามัยซินเคลื่อนที่ไปไม่ถึง โดยมีการศึกษาการส่งถ่ายยีนในเนื้อเยื่อปลายยอดของทิวลิปพบว่าการใช้กานามัยซินคัดเลือกจะมีประสิทธิภาพได้ดีเมื่อใช้เนื้อเยื่อปลายยอดขนาดเล็กในการส่งถ่ายยีน (Wilmink and Jons, 1993) และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical ไม่พบการเกิดสีฟ้า แต่ผลจากการตรวจสอบการ

แสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อปลายยอดบิโอะโลยีที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) พบว่า เกิดสีฟ้า แสดงว่ายีน *gus* ได้ถูกส่งถ่ายเข้าสู่แคลลัสและมีการแสดงออกเนื่องจากผลผลิตของยีน *gus* คือ β -glucuronidase ได้เปลี่ยนสารตั้งต้น x-gluc ให้เป็นสารสีฟ้า (Jefferson, 1987) แต่เกิดแค่เฉพาะบางบริเวณเท่านั้น (ภาพ 4.8) ซึ่งคาดว่าอาจจะเกิดลักษณะที่เรียกว่าไคเมอรา (chimera) เนื่องจากบริเวณเนื้อเยื่อปลายยอดจะเป็นบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ L1 L2 และ L3 โดยชั้น L1 จะเจริญต่อไปเป็นเซลล์ชั้นนอก (epidermis) ชั้น L2 จะเจริญเป็นชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ด้านนอกบางส่วนของท่อน้ำท่ออาหารและโครงสร้างเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ และ ชั้น L3 เป็นเซลล์ที่อยู่ลึกเข้าไปในปลายยอดซึ่งจะเจริญเป็นคอร์เทกซ์ด้านใน ท่อน้ำ (xylem) ท่ออาหาร (phloem) และพืช (pith) ซึ่งการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดนี้คั้งที่ได้ในรุ่น T_0 ส่วนใหญ่จะเกิดลักษณะที่เป็นไคเมอรา ดังนั้น ถ้าหากต้องการผลิตรุ่น T_1 อาจจะไม่จำเป็นต้องใช้การเพาะเลี้ยงโดยใช้เมล็ดจากรุ่น T_0 แต่สามารถทำได้โดยตรงจากเซลล์ที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญโดยการนำบางส่วนของต้น T_0 มาชักนำให้เจริญเป็นต้นและสามารถเพิ่มจำนวนต้นให้มากขึ้นโดยการนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ (Zhong *et al.*, 1996)

นอกจากนี้ พบว่าประสิทธิภาพของการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) มีประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) สอดคล้องกับ Park *et al.* (1996) ได้รายงานการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวสาลีพันธุ์ Maybelle พบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนค่อนข้างต่ำประมาณ 0.7 เปอร์เซ็นต์ และการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) จะไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* เลย ซึ่งคาดว่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์มีระดับความรุนแรงในการบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชและสายพันธุ์ของพืชแตกต่างกันไป (Hiei *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000)

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) จะมีการเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 500 คู่เบส ส่วนต้นข้าวที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอเลย (ภาพ 4.10) แสดงให้เห็นว่ามีการแทรกตัวของยีน *gus* ในโครโมโซมของข้าว

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ได้ และการใช้เนื้อเยื่อปลายยอดเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการส่งถ่ายยีนจะใช้ระยะเวลาเร็วกว่าการใช้เนื้อเยื่ออื่น เช่น โปรโตพลาสต์ แคลลัส เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ประหยัดเวลา และเนื้อเยื่อเกิดความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำ

5.4 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละ จะการศึกษาสูตรอาหารในการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เกิดแคลลัส การทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสและการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ จากนั้นส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

5.4.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 D ในการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เกิดแคลลัส

จากการศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSD (ภาคผนวก ข) ที่เติม 2, 4 D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมล็ดข้าวมีการเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MSD ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตรและเมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และพบว่าความเข้มข้นของ 2,4 D ที่ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เกิดแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6) และพบว่า การใช้ 2, 4 D ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการชักนำแคลลัสในข้าวบือโปะโละ จะทำให้เกิดแคลลัส 2 ลักษณะคือ ไพรเอเบิลแคลลัส (friable callus) และคอมแพคแคลลัส (compact callus) (ภาพ 4.11) โดยที่ไพรเอเบิลแคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ และฟู ซึ่งเป็นแคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการนำมาส่งถ่ายยีน และ คอมแพคแคลลัส (compact callus) เป็นแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อนซึ่งไม่ค่อยนิยมนำแคลลัสลักษณะนี้มาทำการส่งถ่ายยีน นอกจากนี้ ข้าวแต่ละสายพันธุ์ก็มีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของฮอร์โมนแตกต่างกัน มีรายงานการใช้ 2, 4 D ความเข้มข้นอื่นๆ เช่น

รายงานการใช้ 2, 4 D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวปทุมธานี1 และข้าวอินเดียสายพันธุ์ปอคคาลิ (Pokkali, PKL) ข้าวชัยนาท1 ข้าวBRRI dhan-29 ข้าวBRRI dhan-33 และข้าว Binnatoa (Wanichananan *et al.*, 2010; Maneewan *et al.*, 2005; Dowla *et al.*, 2008)

รายงานการใช้ 2, 4 D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวพูสาบาสมาติ1 (Pusa basmati1) ข้าว Kalizira ข้าว Radhunipagol ข้าว Tulsimala (Mohanty *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2009)

รายงานการใช้ 2, 4 D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าว BR22 ข้าว BRRI dhan 29 ข้าว BR5842-15-4-8 ข้าว Moulata (Hoque *et al.*, 2005; Samiphak and Siwarungson. 2006)

รายงานการใช้ 2, 4 D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวHKR-46 ข้าว HKR-126 (Saharan *et al.*, 2004) และรายงานการใช้ 2, 4 D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวภข 6 (Pipatpanukul *et al.*, 2004)

5.4.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวป๊อโปะ

การทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวป๊อโปะ พบว่ากานามัยซินความเข้มข้น ตั้งแต่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปจะมีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวป๊อโปะโดยทำให้แคลลัสชะงักการเจริญเติบโตและเกิดการเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นน้ำตาลเข้ม (ภาพ 4.12) โดยสอดคล้องกับการรายงานของ Pipatpanukul *et al.* (2004) ซึ่งใช้กานามัยซินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนในข้าวภข 6 แต่ Dowla *et al.* (2008) รายงานว่า ใช้กานามัยซิน ความเข้มข้น 20-50 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารคัดเลือกสามารถทำให้แคลลัสหยุดการเจริญเติบโตได้ในข้าวสายพันธุ์ BRRI dhan-29 ข้าว BRRI dhan-33 และข้าว Binnatoa นอกจากนี้ Ratnayake and Hettiarachchi (2010) ได้รายงานถึงการใช้กานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรในข้าวศรีลังกา Bg250 เช่นเดียวกัน ดังนั้น การใช้ยาปฏิชีวนะในการคัดเลือกจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับพืช โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของพืช ชนิดของเซลล์สภาพการเจริญเติบโต และอัตราเมตาบอลิซึมของเซลล์พืช (Anonymous, 2006) และการใช้ความเข้มข้นของกานามัยซินที่ต่ำเกินไปจะทำให้เซลล์แคลลัสที่ไม่ได้รับยีนสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นของกานามัยซินที่อยู่ในระดับสูงจนเกินไปอาจทำให้เซลล์แคลลัสที่ได้รับยีนตายได้เพราะว่าเซลล์ข้างเคียงที่ไม่ได้รับยีนที่ตายแล้วอาจปล่อยสารพิษมายับยั้งการเจริญเติบโตได้ ซึ่งเซลล์ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนนั้นจะทนทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกได้ในระดับความเข้มข้นหนึ่งเท่านั้น (Zhang *et al.*, 2004) เพราะฉะนั้น ในการส่งถ่ายยีนจึงต้องมีการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่ใช้ในการกำจัดเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมักจะเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ปกติตายทั้งหมด เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงถึงแม้ว่าจะกำจัดเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับยีนให้ตายได้แต่ก็อาจทำให้การพัฒนาไปเป็นยอดของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนลดลงด้วย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลงตามไปด้วย (กัญญาและคณะ, 2549)

5.4.3 ผลของการชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้น

จากการทดลองนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร คือ RE1 (ดัดแปลงจาก Samiphak and Siwarungson, 2006) RE2 (ดัดแปลงจาก Zaidi *et al*, 2006) และ RE3 (ดัดแปลงจาก Lin and Zhang, 2005) (ภาคผนวก ข) พบว่า แคลลัสมีการเกิดจุดเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งจุดเจริญนี้จะบ่งบอกว่าเนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาเจริญไปเป็นยอดได้และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE1 จะมีการจุดเจริญมากที่สุดเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) และสามารถชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพ 4.13) ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งค่อนข้างต่ำ โดย Samiphak and Siwarungson. (2006) รายงานการใช้สูตรอาหารชักนำแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิให้เกิดขึ้นสูตร NB-RE1 พบว่าสามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ 5.5 เปอร์เซ็นต์ และการใช้น้ำตาลมอลโตสแทนซูโครสสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสให้เป็นต้นใหม่ได้ในข้าวกลุ่มอินดิกาสายพันธุ์ MDU5 (Zaidi *et al.*, 2006) เป็นที่ทราบกันดีว่าข้าวกลุ่มอินดิกามีการศึกษาในเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อและประสบความสำเร็จค่อนข้างน้อย เนื่องจากข้าวกลุ่มนี้มีการตอบสนองต่ออาหารหรือฮอร์โมนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกลุ่มจาโปนิกา (Hiei *et al.*, 1997) ซึ่งการศึกษาการชักนำแคลลัสให้เจริญไปเป็นต้นใหม่นั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากสำหรับการส่งถ่ายยีนเนื่องจากความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ที่สูงนั้นมีผลต่อความสำเร็จของการถ่ายยีน ดังนั้น สูตรอาหาร สายพันธุ์ข้าว ลักษณะแคลลัสหรืออายุของแคลลัสก็มีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นเช่นกัน (Cho *et al.*, 2004; Vijaychandra *et al.*, 1995)

5.4.4 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

จากการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่าแคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดสามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกได้ (ภาพ 4.14)) แสดงว่ายีน *nptII* ได้ถูกส่งเข้าไปในแคลลัสและมีการแสดงออก เนื่องจาก ยีน *nptII* เป็นยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนนี้จะสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกที่มีการเติมกานามัยซินได้ (Wilmink and Dons, 1993) ส่วนแคลลัสที่ไม่ได้รับยีนจะมีการชะงักการเจริญเติบโตและเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลและน้ำตาลเข้ม เนื่องจากกานามัยซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ของพืชทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตตามปกติได้ (Wilmink and Jons, 1993)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical พบว่าแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดเกิดสีฟ้า (ภาพ 4.15) แสดงว่ายีน *gus* ได้ถูกส่งถ่ายเข้าสู่แคลลัสและมีการแสดงออก เนื่องจากผลผลิตของยีน *gus* คือ β -glucuronidase ได้เปลี่ยนสารตั้งต้น x-gluc ให้เป็นสารสีฟ้า (Jefferson, 1987) เนื่องจากยีน *gus* ทำงานภายใต้โปรโมเตอร์ CaMV35S โดย Hiei *et al.* (1994) รายงานการส่งถ่ายยีนในข้าว พบว่ายีนมีการแสดงออกสูงเมื่อทำงานภายใต้โปรโมเตอร์ CaMV35S ซึ่งขัดแย้งกับ Park *et al.* 1996 ซึ่งรายงานว่าการใช้โปรโมเตอร์ *actin1* ทำให้ยีนมีการแสดงออกมากกว่าการใช้โปรโมเตอร์ CaMV35S

ประสิทธิภาพการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) สูงที่สุดเท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งมากกว่ารายงานของ Hoque *et al.* (2005) ซึ่งส่งถ่ายพลาสมิด pTOK233 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 เข้าสู่แคลลัสข้าวบึงคลาเทศซึ่งเป็นข้าวกลุ่มอินดิกาโดยมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายเท่ากับ 5.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีนจากการทดลองนี้สูงกว่าการส่งถ่ายพลาสมิด pTOK233 เข้าสู่แคลลัสของข้าวกลุ่มจาโปนิกาสายพันธุ์ Radon ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายเท่ากับ 27 เปอร์เซ็นต์ (Aldemita and Hodges, 1996) และเมื่อทดสอบยีน *gus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า แคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะมีการเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 500 คู่เบส (ภาพ 4.16) และจากการทดลองไม่สามารถชักนำแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดให้เจริญเป็นต้นได้ ซึ่งอาจเกิดจากสูตรอาหารอาจจะยังไม่เหมาะสม ซึ่งก็ต้องมีการศึกษากันต่อไป