บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

อ้อยเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดเป็นพืชวงศ์ Poaceae สกุล *Saccharum* มีถิ่นกำเนิดในหมู่เกาะนิวกีนี ทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย และมีการแพร่กระจายไปปลูกยังที่ต่างในโลก เนื่องจากอ้อยเป็นพืชเขตร้อน จึงนิยมปลูกในแถบประเทศเขตร้อนและชุ่มชื้นระหว่างเส้นรุ้งที่ 35 องศาเหนือและ 35 องศาใต้ ได้แก่ ประเทศบราซิล อินเดีย จีน ไทย เม็กซิโก และคิวบา โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดังนี้

1.1 ลำต้น (Clum) เป็นข้อ (Node) และปล้อง (Internode) ชัดเจน (ภาพที่ 1ก) ลำต้นตั้งตรงและมีกาบใบหุ้ม ความสูงประมาณ 2.5- 6 เมตร แต่ละปล้องยาวประมาณ 10 – 15 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดประมาณ 2.5 – 5.0 เซนติเมตร

1.2 ใบ (Leaf) เป็นใบเดี่ยวแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ กาบใบ (Leaf sheath) และแผ่นใบ (Leaf blade) กาบใบโอบหุ้มลำต้น (ภาพที่ 1ข) มีหน้าที่ป้องกันยอดอ่อนหรือเนื้อเยื่อเจริญเหนือข้อ (Intercalary meristem) ที่อยู่ส่วนฐาน แผ่นใบรูปแถบ ขอบใบเป็นหยักคล้ายฟันเรื่อย ผิวด้านนอกของกาบใบมีขนเส้นเล็กปกคลุมอยู่ มีเส้นใบตามยาว ลิ้นใบ (Ligule) อยู่ตรงรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบด้านใน ติ่งใบ (Auricle) อยู่บริเวณขอบของกาบใบ

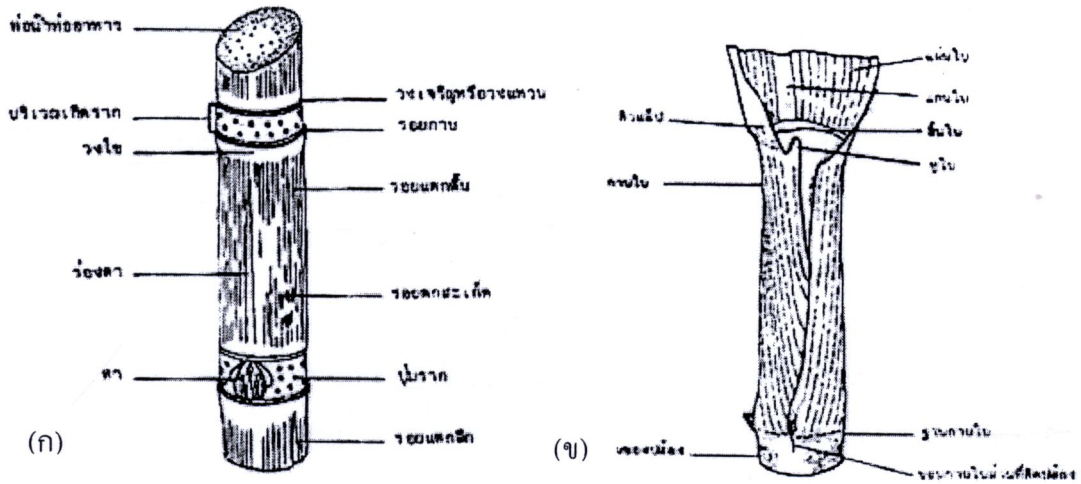
1.3 ช่อดอก (Inflorescence) ออกที่ยอดของลำต้น เป็นช่อแยกแขนงกว้าง (Open-branched panicle) มีความยาวไม่รวมก้านช่อดอกประมาณ 25 - 50 เซนติเมตร ประกอบด้วยแกนกลาง (Main axis) ก้านแขนงใหญ่ซึ่งแยกออกจากแกนกลางและก้านแขนงรองซึ่งแยกจากก้านแขนงใหญ่แล้วจึงจะถึงตัวดอก (spikelet) ก้านแขนงที่ติดกับตัวดอกมีลักษณะเป็นท่อนสั้นเชื่อมติดต่อกัน เมื่อดอกโรยข้อต่อเหล่านี้จะหลุดจากกัน

1.4 ช่อดอกย่อย (Spikelet) เกิดเป็นคู่ตรงข้อของก้านแขนง โดยดอกหนึ่งจะไม่มีก้านดอก (Sessile spikelet) และอีกดอกมีก้านดอก (Pedicelled or stalked spikelet) ดอกทั้งสองชนิดนี้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ โดยดอกแต่ละดอกนั้นวงนอกสุดของดอกมีขนยาวสีขาวเรียกว่า silky hairs ที่เกิดตรงส่วนของฐานดอกและหุ้มอยู่รอบ ๆ ดอก ถัดจากวงของขนยาวสีขาวเข้าไปจะเป็นวงของกลีบดอกสองอันที่หุ้มดอกย่อย (Floret) อยู่ ซึ่งกลีบดอกอันนอกสุดเรียกว่า outer glume และกลีบดอกอันในเรียกว่า inner glume ดอกย่อยที่กลีบดอกทั้งสองหุ้มอยู่นั้นประกอบด้วย 2 ดอกย่อยคือ ดอก

ย่อยอันล่างเป็นหมัน มีเพียง sterile lemma or third glume อันเดียวเท่านั้น และมีขนาดเล็กกว่ากลีบดอกที่หุ้มอยู่ ส่วนดอกย่อยอันบนเป็นดอกที่สมบูรณ์เพศที่ไม่เป็นหมัน

1.5 ผล (Fruit) แบบธัญพืช (Caryopsis) โดยมีผนังผล (Pericarp) เนื้อบางห่อหุ้ม มีขนาดความยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ผลที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3 อาทิตย์ จะแก่และร่วงปลิวไปตามลม โดยอาศัย silky hairs ช่วยพยุงตัว

1.6 ราก (Root) เป็นระบบฝอย (Fibrous root system) แผ่กระจายโดยรอบลำต้นในรัศมี 50 – 100 เซนติเมตร ลึก 100 – 150 เซนติเมตร



ภาพที่ 1 แสดงส่วนประกอบของปล้อง (ก) และกาบใบของอ้อย (ข)

(เกษม สุขสถานและคณะ, 2520)

2. ลักษณะประจำพันธุ์ของอ้อยที่ใช้ในการศึกษา

อ้อยพันธุ์ K92 – 80 เป็นอ้อยที่คัดได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างแม่พันธุ์ สอน.3 และพ่อพันธุ์ สอน.1 ทรงกอค่อนข้างกว้าง ลำค่อนข้างเล็ก มีสีเขียวอ่อน เมื่อแก่มีสีเหลืองอมเขียว มีไขเล็กน้อย วงไข แผ่นใบยาวสีเขียวเข้ม ค่อนข้างกว้าง กาบใบหลุดร่วงยากหลังกาบใบมีขนเล็กน้อย ลิ้นใบเป็นรูปกระจับ ลาดเอียง หูใบมีข้างเดียวลักษณะคล้ายสามเหลี่ยมสั้น สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว แตกกอ 5-7 ลำต่อกอ ไว้ตอได้ดี ทนแล้งได้ดี แต่อ่อนแอต่อโรคใบจุดเหลืองและโรคพกกระบอง ต้านทานปานกลางต่อหนอนเจาะลำต้นและ แมลงหวี่ขาว สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อปลูกในดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย ไม่ออกดอก มีอายุการเก็บเกี่ยว 12 เดือน ให้ผลผลิตอ้อยเฉลี่ย 16 – 19 ตันต่อไร่ คุณภาพความหวาน 11 – 13 ซี.ซี.เอส

3. โรคอ้อย

อ้อยเมื่อเกิดโรคจะมีอาการผิดปกติในการเจริญของต้นอ้อยทางสรีระวิทยา และสัณฐานวิทยา ความผิดปกติอาจเกิดขึ้นที่บริเวณลำต้น ราก หรือใบก็ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตอ้อยต้องสูญเสียไปในแต่ละปีเป็นมูลค่าสูง โรคอ้อยที่สำคัญที่ทำให้อ้อยสูญเสียผลผลิตในแต่ละปี มีสาเหตุจากเชื้อราเป็นส่วนมาก ได้แก่ โรคลำต้นเน่าแดง และโรคราสนิม

โรคลำต้นเน่าแดง (Red rot of stem) เกิดจากเชื้อรา *Glomerella tucumanensis* โดยเชื้อจะเข้าสู่เซลล์พืชทางบาดแผลหรือแผลที่เกิดจากแมลงปากดูดบางชนิด หรือเข้าสู่เซลล์โดยตรงโดยการสร้างเส้นใยแทงเข้าสู่เซลล์พืช อ้อยติดเชื้อจะมีลักษณะภายนอกลำต้นเป็นรอยแผลสีน้ำตาลแดง ปล้องเหี่ยวเน่า ยอดเหลือง ภายในลำต้นจะเป็นสีแดงสลับขาวมีกลิ่นบูดและไม่สามารถนำไปปลูกขยายพันธุ์ได้ เชื้อมีการแพร่ระบาดโดยอาศัยลมและฝน

โรคราสนิม (Rust) เกิดจากเชื้อรา *Puccinia melanocephala* เชื้องอกเส้นใยเข้าทำลายต้นอ้อยทางปากใบ เริ่มแรกใบจะเป็นจุดเล็กๆ สีเหลืองอ่อนจากนั้นแผลจะขยายยาวตามเส้นใบลักษณะคล้ายสนิมเหล็กกระจายทั่วไป ทำให้ใบอ้อยกลายเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายทั้งใบ พบในอ้อยอายุ 5 เดือน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว

นอกจากนี้แมลงศัตรูอ้อยก็เป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตอ้อยลดลง แมลงศัตรูอ้อยที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ หนอนกอลายจุดเล็ก (*Chilo infuscatellus*) หนอนกอลายจุดใหญ่ (*Chilo tumidicostalis* Hampsan.) หนอนกอลายใหญ่ (*Chilo sacchariphagus* Bojer.) หนอนกอสีชมพู (*Sesamia inferens* Walker.) และหนอนกอสีขาว (*Scripophaga excerptalis* Walker.) (โอชา ประจวบเหมาะ และคณะ, 2527)

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืช (Explant) เช่น อวัยวะ เนื้อเยื่อ หรือเซลล์มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล ไวตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาวะที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ โดยมีการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น ส่วนต่างๆของพืชเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ เนื่องจากเซลล์ของพืชมีลักษณะพิเศษที่เรียกว่า Totipotency โดยเซลล์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความสามารถที่จะเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายไซโกต (Zygote) สามารถทำหน้าที่เป็นไซโกตได้ โดยมีการแสดงออกของยีนเหมือนเดิม (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2549) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากในทั้งในด้านเกษตรกรรมอุตสาหกรรม และด้านการแพทย์ เช่น การผลิตพืชปราศจากเชื้อไวรัส การ

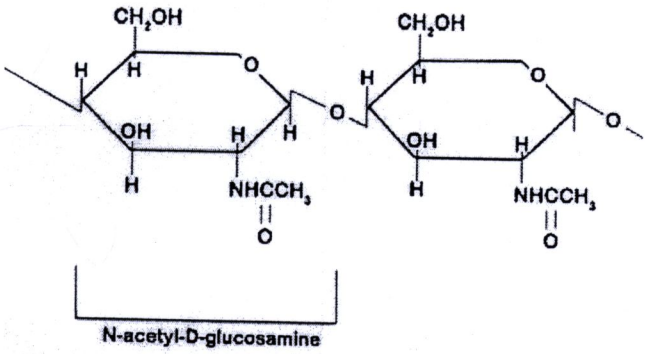
ปรับปรุงและขยายพันธุ์พืช การศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช การเก็บรักษาพันธุ์พืช และการสร้างสารทุติยภูมิ สูตรอาหารที่ได้รับความนิยมในการใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ สูตร Murashige & Skoog (MS) โดยสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วยส่วนประกอบพื้นฐาน ได้แก่ ธาตุอาหารซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พืชต้องการใช้เป็นจำนวนมากเพื่อการเจริญเติบโต อาทิเช่น ไนโตเจน (N) โปรแตสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) กำมะถัน (S) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) นอกจากนี้พืชยังต้องการธาตุอาหารจำพวก เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) และโคบอลท์ (Co) แต่ในปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิดผล จำเป็นต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานของพืชแต่ละชนิดต่อความต้องการสารอาหาร แหล่งคาร์บอน ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดและพันธุ์ของพืช (Polland and Walker, 1990) ความสำเร็จในการสร้างพืชแปลงพันธุ์ ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้เนื้อเยื่อพืชที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นในอัตราที่สูง ใช้ระยะเวลาสั้นมาเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการส่งถ่ายยีน ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพบว่าเกือบทุกชิ้นส่วนของอ้อยสามารถนำมาเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่น ตาข้าง ใบอ่อน และ midrib (Manickasagum, 2004; Virupakshi et al., 2002; Chengalrayan and Gallo-Meacher, 2001; Singh et al., 2008; Kaur et al., 2008; Franklin et al., 2006) การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนของอ้อยขึ้นอยู่กับลักษณะชิ้นส่วนที่นำมาใช้ องค์ประกอบของอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงซึ่งสูตรอาหารที่แตกต่างกันย่อมมีผลต่อการเกิดต้นใหม่ที่แตกต่างกัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1961 ที่ฮาวาย โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรงไคมาจากลำต้นอ้อยพันธุ์ H50-7209 พบว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านการเจริญและโครโมโซม สามารถแยกความแตกต่างได้เป็น 5 ชนิดได้แก่ เซลล์สีขาว 1 กลุ่ม เซลล์สีเหลือง 2 กลุ่ม และเซลล์สีเทาแกมแดงอีก 2 กลุ่ม โดยอาศัยการแยกเป็นเซลล์เดี่ยวร่วมกับการใช้เทคนิค nurse culture ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสที่จะสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมของอ้อยได้ (Nickell, 1964 อ้างถึงใน รัตนา ขามฤทธิ์. 2550) Taylor et al. (1992) รายงานว่าแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนอ้อยที่มีลักษณะจับตัวกันแน่น แข็ง มีสีเหลือง ผิวเรียบ รูปร่างของแคลลัสค่อนข้างกลมเท่านั้นที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆของอ้อยเพื่อให้เกิดเป็นแคลลัสและต้นอ่อนได้ดีนั้น อาหารเพาะเลี้ยงควรมีความสมดุลของเกลือแร่ วิตามิน น้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ อาทิความเข้มข้นของ 2, 4 – D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส บุญยืน กิจวิจารณ์ (2528) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของอ้อยในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง (Modified Murashige and Skoog) พบว่า ใบอ่อนตั้งแต่ปลายยอดออกไปประมาณ 5 เซนติเมตร สามารถเกิดแคลลัสได้ภายใน 1-2 สัปดาห์ ตำแหน่งที่เกิดแคลลัสคือบริเวณรอยตัด

โดยเฉพาะรอยตัดบริเวณกลางใบ สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าบริเวณอื่น และ 2,4-D และ NAA เข้มข้น 3 มก./ล. สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ดีเท่า ๆ กัน แต่ IAA ไม่เหมาะที่จะใช้ในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส การใช้อาหารเสริมคือ yeast extract 20 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ 2,4-D หรือ NAA พบว่า น้ำมะพร้าวมีผลต่อการมีชีวิต ของแคลลัสมากกว่า yeast extract แต่ถ้าเพาะเลี้ยงใบอ่อนในอาหารที่มี NAA เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ BA เข้มข้น 0.1 มก./ล. น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อใบอ่อนเกิดแคลลัสและเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นขนาดเล็กภายใน 4-6 สัปดาห์ รัตนา ขามฤทธิ์ (2550) รายงานการชักนำให้เกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดที่ใบอ่อนของอ้อยพันธุ์มาร์กลอส 66-07 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดที่ใบอ่อนได้ 100 เปอร์เซ็นต์ Ramanand et al. (2006) รายงานว่าที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 4 มก./ล. สามารถชักนำให้ใบอ่อนอ้อยเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด Gurpreet Singh et al. (2007) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในอ้อยพันธุ์ CoJ 88 ลดเหลือ 75.92% เมื่อเพิ่มปริมาณ 2, 4 – D จาก 4 มก./ล. เป็น 8 มก./ล. และไม่มีการเกิดแคลลัสเลยในอาหารสูตรดัดแปลงที่เติมน้ำตาลมอลโตส 70 ก./ล. นอกจากนี้ยังพบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจาก 30 ก./ล. เป็น 70 ก./ล. ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง พรทิพย์ วงศ์แก้ว (2542) รายงานการกระตุ้นการสร้างต้น จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของอ้อยในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. และ BAP 0.5 มก./ล. พบว่าสามารถกระตุ้นการเกิดต้นอ่อนในอัตรา 20 – 50 ต้นต่อหนึ่งตาข้าง Ciiengalrayan and Gallo-Meagiier (2001) รายงานว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม thidiazuron (TDZ) สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดในอ้อยพันธุ์ CP 84 – 1198 ได้ดีกว่าสูตรอาหารที่เติม Zeatin หรือ Kinetin

5. ไคติน (Chitin)

ไคติน หรือ poly –β – (1,4)-2-acetamide-2-deoxy-D-glucose เป็นอินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากเซลลูโลส จัดอยู่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างเส้นใยคล้ายคลึงกับเซลลูโลส ไคตินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต เช่น กุ้ง แมลง เปลือกหอย ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวบางชนิด ไส้เดือนฝอย ยีสต์ และเห็ดรา ประกอบด้วยสารอะมิโนโพลิแซกคาไรด์ของโมเลกุลเดี่ยวกลูโคซามีนหลายโมเลกุลต่อกันเป็นสายยาวโดยไม่มีการแตกแขนง มีหน่วยย่อยคือ N-acetylglucosamine ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β–1, 4 glucosidic และไคตินเป็นสารโมเลกุลยาวที่ไร้ประจุ (Non-electrolytic polymer) ซึ่งทำให้ไคตินไม่ละลายในสารละลายทั่วไป ไคตินในธรรมชาติ พบว่ามีการจัดเรียงตัวอยู่ 3 แบบ ได้แก่ พวกที่จัดเรียงตัวกันแน่น พบมากในผนังเซลล์ของเชื้อราและเปลือกแมลง พวกที่มีการจัดเรียงตัวแบบขนานกัน และ

พวกที่มีการจัดเรียงตัวโดยมีสายยาวของไคตินอยู่ 2 สาย ปกติแล้วจะไม่พบรูปแบบทั้ง 3 ชนิดอยู่ในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของไคติน (Sam Nyachwaya, 2005)

6. ไคติเนส (Chitinase)

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งสามาย่อยสลายไคตินให้ได้เป็น N-acetylglucosamine อิสระ มีชื่อทางเคมีว่า poly-β-1,4(2-acetamide-2-deoxy)-D-glucose gycanohydrolase:E.C.3.52.1.1.4 ซึ่งตัดสายยาวของ N-acetylglucosamine ตรงตำแหน่ง β ภายในสายยาว โดยตัดแบบสุ่มให้ได้สายสั้นๆ ของ N-acetylglucosamine เอนไซม์ไคติเนสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ แต่ก็พบว่ามีสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ซึ่งไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบแต่สามารถสร้างไคติเนสได้ เช่น พืช เชื้อราแอคติโนมัยซีส และแบคทีเรียบางชนิดที่ใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ไคติเนสที่พบในพืช เช่น ข้าว ยาสูบ แตงกวา และมะละกอ เกิดจากการที่พืชถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก เอนไซม์ไคติเนสมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดและแมลงศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก

7. การส่งถ่ายยีนสู่พืช (Plant gene transfer)

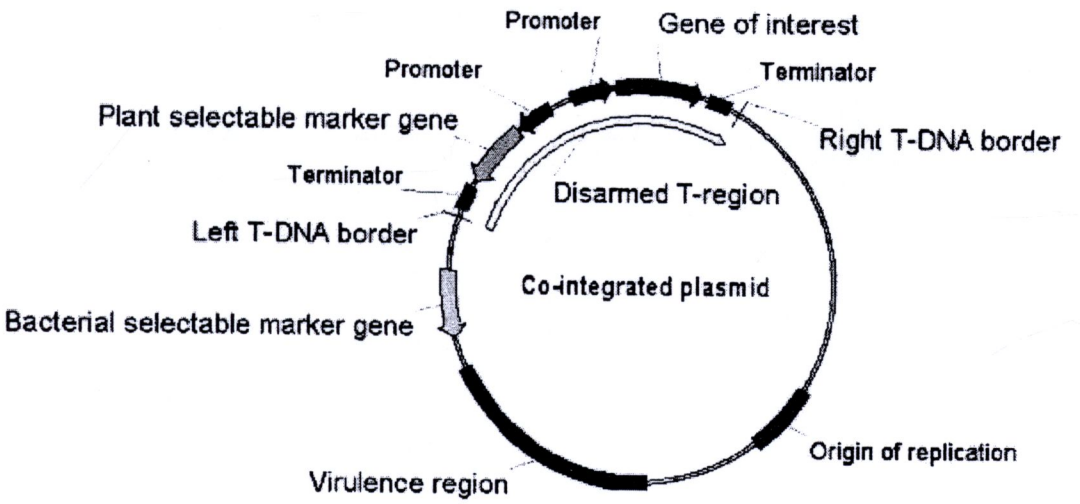
การส่งถ่ายยีนสู่พืช เป็นกระบวนการส่งถ่ายยีนที่สนใจ ซึ่งอาจเป็นยีนที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าไปสอดแทรกกับโครโมโซมของพืชอย่างเสถียร โดยผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) และไมโทซิส (Mitosis) โดยเรียกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนว่าพืชแปลงพันธุ์ หรือพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Walden, 1989 อ้างใน สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) ในการส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่พืชนั้น ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนสู่พืชมี 2 วิธี ได้แก่ การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย

Agrobacterium (*Agrobacterium*-mediated gene transformation) และการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง (direct gene transformation)

7.1 การส่งถ่ายยีนโดย *Agrobacterium*

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในดิน จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) มีขนาด 0.6-1.0 μm x 1.5-3.0 μm หายใจแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic bacteria) เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา และสืบพันธุ์แบบไม่สร้างสปอร์ (Dovey et al., 1994) *Agrobacterium* มี 4 ชนิด คือ *A. tumefaciens, A. rhizogenes, A. rubi* และ *A. radiobacter* *Agrobacterium* เป็นสาเหตุของโรค crown gall ในพืชโดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ และในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด ซึ่งพืชที่ได้รับเชื้อจะมีการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็วไม่จำกัด เกิดเป็นลักษณะปุ่มปมขนาดผิดปกติขนาดใหญ่ (ภาพที่ 3) เนื่องจากภายในเชื้อ *Agrobacterium* จะมี extrachromosomal plasmid เป็นตัวชักนำให้เกิดปุ่มปม เรียกว่า Ti (Tumor inducing) พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวนอยู่นอกโครโมโซม (ภาพที่ 3) มีขนาดประมาณ 150-200 กิโลเบส Ti plasmid ที่พบมี 2 ชนิด ได้แก่ Octopine และNopaline เป็นสารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นตามชนิดของพลาสมิด ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ *Agrobacterium* สามารถนำไปใช้ได้ (Messen et al., 1985) และบน Ti plasmid ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ T-DNA ที่มีขนาดประมาณ 20-23 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน tryptophan monoxygenase (*IaaM, tms1*) และยีน indole acetamide hydrolase (*tms2*) ที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนออกซินและยีน isopentenyl transferase (*tmr*) ที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนไซโตไคนินซึ่งเป็นสาเหตุของโรคcrown gall ทำให้เนื้อเยื่อเจริญอย่างรวดเร็ว ไม่จำกัด ส่งผลให้เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดหรือรากได้ ถ้ายีน *tms* เกิดการกลายพันธุ์ จะทำให้เนื้อเยื่อปุ่มปมเกิดการพัฒนาไปเป็นยอด แต่ถ้ายีน *tmr* กลายพันธุ์เนื้อเยื่อดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นราก (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543) ขอบเขตของดีเอ็นเอ (DNA border) กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำประมาณ 25 คู่ เบสทั้งสองข้างของ T-DNA เรียกว่า Left border (LB) และ Right border (RB) ส่วนที่ 2 คือ Virulence (vir) region ขนาดประมาณ 40 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน 6 ตำแหน่ง คือ *vir*A, *vir*B, *vir*C, *vir*D, *vir*G และ*vir*E มีหน้าที่สำคัญในการส่งถ่ายยีน T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช โดย *vir* gene จะมีรหัสในการสังเคราะห์เอนไซม์ endonuclease ซึ่งตอบสนองต่อสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) เช่น acetosyringone และ alpha-hydroxy-acetosyringone (Godwin et al,. 1991) ที่พืชหลั่งเมื่อเกิดบาดแผล แล้วไปมีผลต่อการชักนำให้ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช และสามารถสอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมพืช

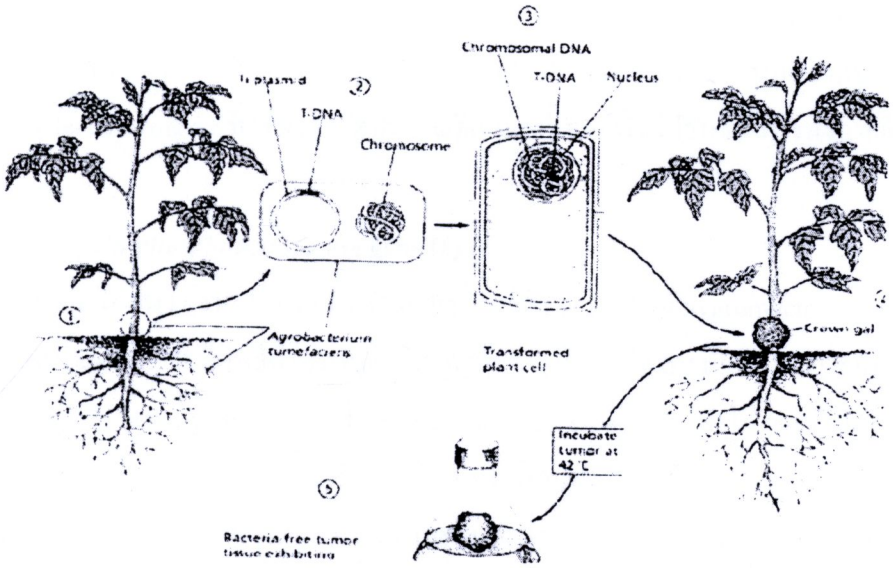
ภาพที่ 3 แสดงการเกิดปุ่มปมในต้นมะเขือเทศ (Aloni et al. 1998)



ภาพที่ 4 Ti plasmid (Anonymous, 2007)

กลไกการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *Agrobacterium* ในธรรมชาติ เกิดขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผลจะปล่อยสารประกอบฟีนอล (Phenolic componds) ออกมา ซึ่งสารดังกล่าวจะกระตุ้นให้ *Agrobacterium* เคลื่อนที่แบบ chemotaxis มายังบริเวณที่มีบาดแผลจากนั้น *virA* gene เป็นยีนตัวแรกที่ตอบสนองต่อสารประกอบฟีนอลที่พืชหลั่งออกมา จะเกิดการลอกรหัสสร้างโปรตีน vir A เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของ *vir G* gene ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าโปรตีน vir A และ vir G เป็น regulatory protein โปรตีน vir A จะทำหน้าที่จดจำสารประกอบฟีนอลได้โดยการเกิดกระบวนการ autophosphorylation และกระตุ้นการทำงานของโปรตีน vir G ในการเกิดกระบวนการ phosphorylation จากนั้นโปรตีน vir G

จะกระตุ้น *vir* gene ตัวอื่นให้แสดงออก โดย *virD1* gene จะทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน vir D1 ที่ทำหน้าที่เป็น topoisomerase enzyme และ *virD2* gene สังเคราะห์โปรตีน vir D2 ทำหน้าที่เป็น endonuclease enzyme ตัดส่วน T-DNA ให้หลุดออกจากพลาสมิด ได้เป็น T-strand หลังจากนั้นโปรตีน virE จะเข้าเกาะบริเวณ 5' ของ T-strand เป็น T-complex เพื่อป้องกันไม่ให้สาย DNA ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ exonuclease จากพืชหรือแบคทีเรียชนิดอื่นในระหว่างการส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่พืช โดยการสอดแทรกของ T-DNA เข้าสู่จีโนมของพืชเป็นแบบซุ่มหรืออาจจะมีตำแหน่งภายในจีโนมที่สามารถเข้าสอดแทรกได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง (Wallroth et al., 1986 อ้างถึงใน Davey et al., 1994)



ภาพที่ 5 กลไกการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *Agrobacterium tumefaciens* (Taiz and Zeiger, 1998 อ้างถึงใน พูนพิภพ เกษมทรัพย์, 2006)

7.2 โปรโมเตอร์ (Promoter)

โปรโมเตอร์เป็นส่วนของดีเอ็นเอ ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป ซึ่งจะมีลำดับเบสจำเพาะเพื่อให้เอนไซม์ RNA polymerase สามารถจดจำและเข้าเกาะเพื่อทำการลอกรหัสได้ ในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ 2 ชุด ได้แก่ TATA-box หรือ -25 sequence และ CAAT-box หรือ -75 sequence โปรโมเตอร์ที่ใช้ส่งถ่ายยีนอาจเป็นชนิดที่สามารถแสดงออกได้ตลอดเวลาและในเนื้อเยื่อทุกชนิด (Constitutive promoter) หรือแสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อใดเนื้อเยื่อหนึ่ง (Tissue specific promoter) หรือโปรโมเตอร์ที่จะแสดงออกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม (Inducible promoter)

7.3 ยีนเครื่องหมาย (Selectable maker gene)

ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการเพื่อใช้ในการคัดเลือกเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีนเข้าไป ซึ่งขั้นตอนนี้มีความสำคัญมากในกระบวนการการส่งถ่ายยีนสู่พืช เพราะในการแยกระหว่างเนื้อเยื่อหรือเซลล์พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากกัน ยีนเครื่องหมายที่ใช้มักเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น *hygromycin phosphotransferase* gene (*hpt*) ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน, *neomycin phosphotransferase* II gene (*npt* II) ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และ *bar* gene ต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช เช่น biolaphos (Hiei et al.. 1994) โดยชิ้นส่วนพืชแปลงพันธุ์ซึ่งมียีนเครื่องหมายอยู่จะสามารถสังเคราะห์โปรตีนที่ต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวได้ ยีนเครื่องหมายที่นิยมใช้ศึกษามักเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside นอกจากนี้ยังมียีนอีกประเภทคือ Selectable maker ที่ใช้ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เซลล์พืชได้รับจากการส่งถ่ายยีน

7.4 *Hygromycin phosphotransferase* gene (*hpt*)

ยีน *hptII* โคลนได้จาก *E. coli* มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (HPT) ที่ฤทธิ์ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน บี โดยไฮโกรมัยซินจะเกาะกับ binding site ของ elongation factor 2 (EF-2) มีผลยับยั้ง peptide chain elongation ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ เอนไซม์ HPT จะทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) ให้แก่หมู่ไฮดรอกซิลของไฮโกรมัยซิน เพื่อให้เซลล์สามารถต้านทานต่อไฮโกรมัยซินได้ (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) ไฮโกรมัยซินเป็นหนึ่งในสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการคัดเลือกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวดัดแปลงพันธุกรรม เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว และกล้วยไม้ (Yu et al,. 1999)

7.5 ยีนรายงานผล (Reporter gene หรือ Screenable marker gene)

ยีนรายงานผลเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ตรวจสอบว่าโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนที่ส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อมีการแสดงออกหรือไม่ ซึ่งยีนรายงานผลจะควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ส่งผลต่อยีนที่ส่งถ่ายเข้าให้แสดงออก (Christou. 1997) ตัวอย่างยีนรายงานผล ได้แก่ *gus* (β-gluconidase), *cat* (chloroamphenical acetyltransferase), β-galactosidase, *luc* (firefly luciferase), nos (nopaline synthase), ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการการสังเคราะห์ anthocyanin และยีนที่ควบคุมการสร้าง green fluorescent protein (GFT)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

7.5.1 *Beta-glucuronidase* gene (*gus*)

gus gene เป็นยีนที่ได้มาจาก *E. coli* สามารถตรวจสอบการทำงานของยีน *gus* โดยวิธี Histochemical assay โดยใช้ 5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D-glucuronide (X-gluc) เป็นสารละลายซับสเตรท ผลที่แสดงออกของเอนไซม์ β-glucuronidase จะจำเพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อหรือชนิดของเซลล์ที่ใช้ศึกษา ซึ่งส่วนที่ได้รับยีน *gus* เนื้อเยื่อนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ β-glucuronidase ที่เปลี่ยน X-gluc ให้เป็น 5-bromo-4-chloro-3-indico ซึ่งมีสีฟ้า (Croy, 1993 อ้างถึงใน สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) ดังสมการ

$$\text{5-bromo-4-chloro-3-indole-}\beta\text{-D-glucuronide} \xrightarrow{\beta\text{-glucuronidase}} \text{5-bromo-4-chloro-3-indico}$$

(ใสไม่มีสี) (สีฟ้า)

8. Acetosyringone

Acetosyingone เป็นสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งพืชจะสร้างออกมาเมื่อเกิดบาดแผล สามารถกระตุ้นการทำงานของ *vir* gene จึงนิยมใช้ในการส่งถ่ายยีนสู่พืช โดยใช้ acetosyringone ในการบ่มชิ้นส่วนพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพดเป็นต้น (Hiei et al., 2004; Ishida et al.,1996; Cheng et al., 1997) เนื่องจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวส่วนใหญ่ไม่มีการสังเคราะห์สารดังกล่าว Manickavasagum et al., 2004 รายงานการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์ Co9260 และ Co671 โดยใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 50 μM ในการบ่ม *A. tumefaciens* ร่วมกับเนื้อเยื่อบริเวณตาข้างของอ้อยสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 26 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 203374
เลขเรียกหนังสือ

9. การส่งถ่ายยีนสู่อ้อยโดยใช้ *Agrobacterium*

การใช้ *Agrobecterium* เป็นพาหะในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยเพื่อปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้มีลักษณะที่ต้องการ เช่น สร้างพืชแปลงพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อโรคและแมลง สารเคมีกำจัดวัชพืชเป็นต้น โดย Manickavasagum et al. (2004) รายงานการส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase (II) phosphinotricin acetyltransferase (*bar*) และβ-glucuronidase (*gus*-intron) สู่อ้อยลูกผสม (*Saccharum* species) โดยใช้ *Agrobacterium* strain LBA4404 และ EHA105 พบว่าอ้อยแปลงพันธุ์ สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช คัดเลือกอ้อยแปลงพันธุ์โดยใช้ kanamycin genetin และ phosphinotricin ตรวจสอบการส่งถ่ายยีนโดยใช้ GUS assay และ PCR รวมทั้ง

ตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วยวิธี Southern analysis Zhangsun et al. (2007) รายงานการส่งถ่ายยีนที่สร้างโปรตีน GNA ซึ่งมีพิษต่อแมลงเช่น เพลี้ย เข้าสู่อ้อยสายพันธุ์ FN81 – 745 และ Badila โดยใช้ *A. tumefaciens* คัดเลือกสายพันธุ์ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้ hygromycin, kanamycin และ phosphinotricin ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค PCR และ Southern analysis Arencibia et al. (1998) พบว่าการผึ่งแคลลัสอ้อยพันธุ์ Ja 60-5 ให้แห้งก่อนทำการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนได้ รัตนา ขามฤทธิ์ (2550) รายงานการส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ Chitinase เข้าสู่อ้อยสายพันธุ์ Phil 66-07 เพื่อให้เกิดความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูอ้อย โดยใช้ *A. tumefaciens* และวิธี particle bombardment ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS assay และเทคนิค PCR