บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอ้อย

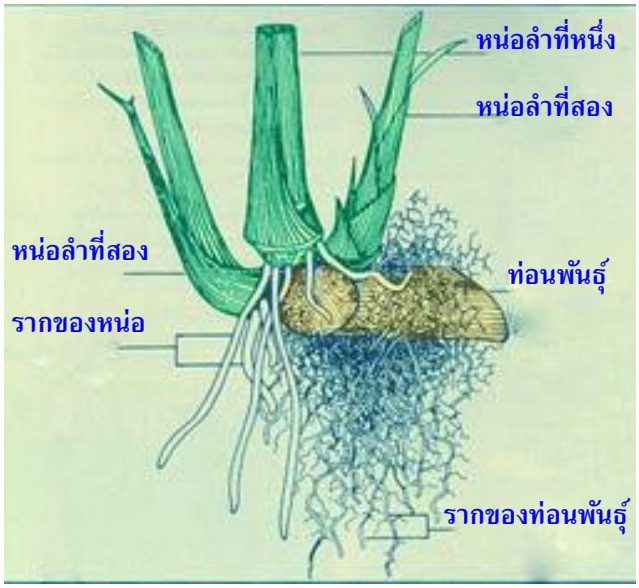
อ้อย เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดเป็นพืชวงศ์ Graminaea สกุล *Saccharum* อ้อยเป็นพืชที่มีจีโนมซับซ้อน มีโครโมโซมตั้งแต่ 40 ขึ้นไปจนมากกว่า 140 อ้อยเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มากในแง่ของการใช้เป็นอาหาร โดยเป็นพืชที่มีความสำคัญอันดับ 4 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าว เนื่องจากอ้อยเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย มีถิ่นกำเนิดในหมู่เกาะนิวกินี ทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย และมีการแพร่กระจายเนื่องจากการนำไปปลูกยังแหล่งต่าง ๆ ปัจจุบันอ้อยมักจะนิยมปลูกในประเทศแถบเขตร้อนและชุ่มชื้นระหว่างเส้นรุ้งที่ 35 องศาเหนือ และ 35 องศาใต้ ประเทศที่มีการปลูกอ้อยเป็นจำนวนมาก ได้แก่ บราซิล อินเดีย จีน เม็กซิโก ไทย และคิวบา เมื่อนำเมล็ดอ้อยมาเพาะ รากที่เจริญออกมาจากเมล็ดอ้อยนั้นก็จะมีระบบรากแบบรากฝอยเช่นเดียวกับธัญพืชทั่ว ๆ ไป แต่เนื่องจากว่าอ้อยมีการขยายพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์ ซึ่งท่อนพันธุ์ที่ได้นี้มาจากการตัดลำต้นออกเป็นท่อน แต่ละท่อนมีตาอย่างน้อยหนึ่งตา เมื่อนำท่อนพันธุ์อ้อยไปปลูกในดิน ตาก็จะเจริญขึ้นมาเป็นต้นอ่อน ขณะเดียวกันปุ่มราก (root primodia or root initial) ที่ข้อของท่อนพันธุ์จะเจริญออกมาเพื่อทำหน้าที่ดูดน้ำและธาตุอาหารให้กับต้นอ่อน รากที่งอกออกมาจากท่อนพันธุ์นี้เรียกว่า รากของท่อนพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นเล็ก ๆ และแตกแขนงมาก ต่อมาเมื่อต้นอ่อนเจริญเติบโตขึ้น ที่ข้อของต้นอ่อนที่อยู่ในดินจะงอกรากที่เรียกว่า รากของหน่อ ทำหน้าที่ดูดน้ำและธาตุอาหารแทน ส่วนรากของท่อนพันธุ์ก็จะสิ้นสภาพและแห้งตายไป รากของหน่อนี้มีลักษณะใหญ่กว่า และแข็งแรงกว่ารากของท่อนพันธุ์ ซึ่งรากนี้จะเจริญเติบโตเป็นรากถาวรของต้นอ้อยต่อไป ความยาวและการแพร่กระจายของรากถาวรนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะดินและความอัดแน่นของดิน อย่างไรก็ตาม รากถาวรของอ้อยที่เติบโตเต็มที่แล้วจำแนกออกได้ 3 ชนิด คือ รากค้ำยัน (buttress root) เป็นรากที่เกิดจากโคนของหน่ออ้อย รากฝอย (fibrous root or superficial root) เป็นรากที่เจริญอยู่ในชั้นดินลึกประมาณ 25-60 ซม. แผ่กระจายออกรอบ ๆ ลำต้นยาวประมาณ 2 เมตร หรือมากกว่า รากชนิดนี้มีขนาดเล็กและแตกแขนงมาก และรากหยั่งลึก (deep root) มีลักษณะคล้ายเส้นเชือกรวมอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ที่หยั่งลึกดิ่งลงไปในดิน อาจลึกถึง 6 เมตรก็ได้ ถ้าดินมีความร่วนซุยดี รากชนิดนี้สามารถดูดน้ำในดินที่ระดับความลึก 2-4 เมตร ทำให้อ้อยทนสภาพแห้งแล้งได้ (ภาพที่ 1) ตาอ้อยที่เจริญจากท่อนพันธุ์ที่นำไปปลูก จะเติบโตเป็นหน่ออ้อยอันแรก (mother or primary shoot) แทงทะลุโผล่ขึ้นมาเหนือพื้นดินเจริญเป็นลำต้นอ้อย ต่อมาตาที่โคนของหน่ออ้อยที่อยู่ในดินก็จะเจริญเติบโตขึ้นมาเป็นหน่ออ้อยอันที่สอง (secondary shoot) และตาของหน่ออ้อยอันที่สองก็จะ

เจริญเป็นหน่ออ้อยอันที่สาม (tertiary shoot) ตามลำดับ ซึ่งลักษณะเช่นนี้เป็นการแตกแขนงของอ้อยออกไปเรื่อย ๆ ทำให้อ้อยเจริญอยู่เป็นกอที่เรียกว่า กออ้อย

ลำต้นอ้อย (cane or culm or stalk) มีลักษณะเป็นลำตั้งตรงและมีกาบใบหุ้ม ความสูงประมาณ 2.5-6 เมตร ไม่แตกกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยข้อ และปล้อง ความยาวของปล้องจากรอยกาบใบ อันหนึ่งถึงรอยกาบใบอีกอันหนึ่งหรือเป็นความยาวของข้อและปล้องรวมกันเรียกว่า joint ดังนั้นลำต้นอ้อยจะประกอบด้วย joint หลาย ๆ อัน ขนาดของ joint แตกต่างไปตามพันธุ์ โดยทั่วไป joint แต่ละอันมีความยาวประมาณ 5-25 ซม. และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-6 ซม. โดย joint ตอนโคนและตอนปลายของลำต้นมีขนาดสั้นมาก นอกจากนี้รูปร่างของ joint ก็ขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์ด้วย ซึ่งสามารถแบ่งรูปร่างออกได้ 6 ลักษณะ คือ ทรงกระบอก (cylindrical) มัดข้าวต้ม (tume-scent) กลางคอด (bobbin-shaped) โคนโป่ง (conoidal) ปลายโป่ง (obconoidal) และ โค้ง (concave-convex) ส่วนการจัดเรียงของ joint นั้น มี 2 แบบ คือ แบบเส้นตรง และแบบซิกแซก สำหรับสีของลำต้นอ้อยก็จะผันแปรไปตามลักษณะประจำพันธุ์และสิ่งแวดล้อม อ้อยบางพันธุ์อาจมีสีเขียว สีเหลือง สีน้ำตาล หรือสีม่วงแก่

บริเวณของข้ออ้อยคือ บริเวณที่เกิดราก ซึ่งเป็นบริเวณตั้งแต่รอยกาบใบจนถึงวงเจริญหรือเนื้อเยื่อเจริญ บริเวณข้ออ้อยที่เกิดราก มีปุ่มราก (root primordia) อยู่กระจัดกระจายทั่วไป และมีตาอ้อยอยู่ข้อละหนึ่งตาเกิดสลับกัน แต่อาจพบว่าข้ออ้อยบางข้ออาจมีตามากกว่าหนึ่งตา หรืออาจจะไม่มีตาก็ได้

ส่วนปล้องของอ้อยซึ่งเป็นบริเวณที่นับจากวงเจริญขึ้นไปจนถึงกาบใบนั้น ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 4 ส่วนคือ วงไข (wax ring) เป็นส่วนที่อยู่ใต้กาบใบ โดยปกติมีสีขาว รอยแตกลายงา (corky crack or ivory marking) เป็นรอยแตกมีลักษณะเป็นเส้นยาว ๆ บนผิวลำต้น และรอยแตกหลาย ๆ รอยอาจรวมกันเป็นแผ่นเรียกว่า corky patch รอยแตกลึก (growth crack or rind crack) เป็นรอยแตกที่มีขนาดใหญ่ตามความยาวของลำต้นลึกเข้าไปถึงเนื้ออ้อยรอยแตกนี้จะก่อให้เกิดความเสียหาย และเป็นบริเวณที่ศัตรูของอ้อยเข้าทำลายได้ และร่องตา (bud furrow or eye groove) เป็นร่องที่เกิดขึ้นเหนือตาอ้อยขึ้นไป



ภาพที่ 1 การเกิดรากและหน่ออ้อย

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, 2523

ใบอ้อยประกอบด้วยกาบใบ (leaf sheath) ที่หุ้มลำอ้อยกับแผ่นใบ (leaf blade) ที่แผ่กางออกไปจากลำอ้อยสลับกันทั้งสองข้าง ใบแรก ๆ ที่เจริญจากตาเป็นใบเกล็ด (scale leaf) เมื่ออ้อยเจริญเติบโตขึ้น ใบอ้อยก็จะมีขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีขนาดสูงสุด หลังจากนั้นใบอ้อยจะค่อย ๆ มีขนาดเล็กลงเมื่ออ้อยใกล้ออกดอก จำนวนใบก็เช่นเดียวกัน พบว่าอ้อยในระยะที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีใบประมาณ 10 ใบ เมื่อมีใบอ้อยเจริญขึ้นมาใบที่แก่ที่สุดจะแห้งและตายไป ใบที่แห้งนั้นอาจจะร่วงหลุดไปจากลำต้นหรือยังคงอยู่ติดกับลำต้นก็ได้ ส่วนล่างสุดของกาบใบติดกับปล้องตรงข้อ และหุ้มรอบลำต้นไว้โดยส่วนขอบของกาบใบจะเหลื่อมซ้อนทับกัน ผิวด้านนอกของกาบใบมีขนเล็ก ๆ ปกคลุมอยู่ ซึ่งลักษณะของกลุ่มขน และการร่วงของกลุ่มขนที่กาบใบนี้เป็นลักษณะประจำพันธุ์อ้อยแต่ละชนิด ใบอ้อยประกอบด้วยส่วนที่สำคัญคือ แผ่นใบ ที่เรียวแหลมสู่ปลายใบ ขอบใบเป็นจักรคล้ายฟันเลื่อย กับส่วนที่สำคัญอีกอันหนึ่งคือ แกนใบ (midrib) ซึ่งอยู่ตรงกลางของใบอ้อย บริเวณส่วนฐานของใบอ้อยที่ต่อกับกาบใบนั้นเรียกว่า คอใบ (dewlap or collar or joint triangle) มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมแข็งและหนาสองรูปพบกันที่ฐานของกาบใบ ส่วนด้านในของรอยต่อระหว่างใบกับกาบใบจะมีลิ้นใบ (ligule) เป็นแผ่นบาง ๆ แนบชิดกับส่วนของลำต้นทำหน้าที่เป็นแผ่นเยื่อกันน้ำ สำหรับส่วนบนสุดของกาบใบที่หุ้มลำต้นนั้น ขอบของกาบใบเป็นติ่งเรียกว่า เขี้ยวใบหรือหูใบ (auricle) หูใบนี้อาจจะมีข้างเดียวหรือมีทั้งสองข้างหรือไม่มีเลยก็ได้ ดังนั้นในการจำแนกพันธุ์อ้อยนอกจากใช้กลุ่มขนที่กาบใบแล้ว ยังต้องพิจารณาถึงขนาด รูปร่าง และสีของใบ แกนกลางใบ คอใบ ลิ้นใบ และหูใบ อีกด้วย

เมื่ออ้อยแก่เต็มที่และอยู่ในช่วงออกดอก อ้อยจะแทงช่อดอกออกจากกาบของใบธง (flag leaf) ที่อยู่ตรงส่วนบนสุดของลำต้น ช่อดอกอ้อยนี้เรียกว่า arrow or tassel มีลักษณะ เป็นพู่ เป็นช่อดอกแบบ panicle รูปร่าง ขนาด และสีของช่อดอกจะแตกต่างไปตามลักษณะประจำพันธุ์ ช่อดอกประกอบด้วยแกนกลาง (main axis or rachis) ก้านแขนงแรก (lateral axis or primary branch) และก้านแขนงชั้นที่สอง (secondary branch) หรือบางทีอาจมีก้านแขนงชั้นที่สาม (tertiary branch) อีกก็ได้ ความยาวของแกนกลางช่อดอกอาจยาวตั้งแต่ 25-50 ซม. และมีก้านแขนงแตกออกโดยรอบ ที่ส่วนของก้านแขนงเป็นที่เกิดของดอกอ้อยเรียก spikelet ดอกอ้อยนี้จะเกิดเป็นคู่ตรงข้อของก้านแขนง โดยดอกหนึ่งจะไม่มีก้านดอก (sessile spikelet) และอีกดอกมีก้านดอก (pedicelled or stalked spikelet) ดอกทั้งสองชนิดนี้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีลักษณะต่าง ๆ ของดอกเหมือนกันทุกประการ โดยดอกแต่ละดอกนั้นวงนอกสุดของดอกมีขนยาวสีขาว เรียกว่า silky hairs ที่เกิดตรงส่วนของฐานดอกและหุ้มอยู่รอบ ๆ ดอก ถัดจากวงของขนยาวสีขาวเข้าไปจะเป็นวงของกลีบดอกสองอันที่หุ้มดอกย่อย (floret) อยู่ ซึ่งกลีบดอกอันนอกสุดเรียกว่า outer glume และกลีบดอกอันในเรียกว่า inner glume ดอกย่อยที่กลีบดอกทั้งสองหุ้มอยู่นั้นประกอบด้วย 2 ดอกย่อยคือ ดอกย่อยอันล่างเป็นหมัน มีเพียง sterile lemma or third glume อันเดียวเท่านั้น และมีขนาดเล็กกว่ากลีบดอกที่หุ้มอยู่ ส่วนดอกย่อยอันบนเป็นดอกที่สมบูรณ์เพศที่ไม่เป็นหมัน ซึ่งอ้อยพวก *S. spontaneum* จะมี sterile lemma ด้วย แต่อ้อยพวก *S. officinarum* จะมีเพียง fertile palea เท่านั้น ภายในดอกย่อยอันบนประกอบด้วย lodicules 2 อัน บังคับให้ดอกบาน เกสรตัวผู้ 3 อัน และเกสรตัวเมีย 1 อัน ซึ่งยอดเกสรตัวเมียแยกออกเป็น 2 แฉก มีสีม่วง ลักษณะเป็นขนนก (purplish feathery stigma) ผลมีขนาดเล็กละเอียดมีขนาดความยาวประมาณ 1 มม. เรียกว่า caryopsis ผลที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3 สัปดาห์ จะแก่และร่วงปลิวไปตามลมโดยอาศัย silky hairs ช่วยพยุงตัว (กรมวิชาการเกษตร, 2523) (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ลักษณะต้นอ้อย (*S. officinarum* L.)

ที่มา: http://www.biotox.cz/botanicus/jpg/bph_0075.jpg

2. การจำแนกชนิดของอ้อย

1. อ้อยปลูกดั้งเดิม (*S. officinarum* L.) เป็นอ้อยที่เกิดแถบเกาะนิวกินี ลักษณะของอ้อยชนิดนี้ถือเป็นลักษณะประจำของพืชในสกุลนี้ ลักษณะที่สำคัญคือลำใหญ่ใบยาวและกว้าง มีน้ำตาลมาก เปลือกและเนื้อนิ่มและมีสีสวย ซึ่งเรารู้จักกันในนามของ "อ้อยเคี้ยว" อ้อยชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลทรายของโลกในสมัยเริ่มแรกเป็นอย่างมาก อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันก็มาจากอ้อยชนิดนี้ ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงประวัติและถิ่นฐานดั้งเดิมของอ้อยจึงหมายถึงอ้อยชนิดนี้เสมอ

2. อ้อยป่าแถบร้อน (*S. spontaneum* L.) เป็นอ้อยป่าซึ่งขึ้นอยู่ทั่วไปในแถบร้อนและชุ่มชื้น มีอยู่หลายร้อยชนิดแตกต่างกันตามแหล่งกำเนิด แต่มีลักษณะที่สำคัญคล้ายคลึงกัน ขึ้นอยู่เป็นกอมีลำต้นใต้ดิน (rhizome) ลำต้นผอมและแข็ง ไส้กลวงมีความหวานน้อย ในประเทศไทยเรียกว่าแขมพง หรือ อ้อยป่า (wild cane)

3. อ้อยอินเดีย (*S. barberi* Jesw.) เป็นอ้อยที่มีถิ่นกำเนิดในอินเดียตอนเหนือ นักวิชาการเชื่อกันว่าเป็นอ้อยที่เกิดจากการผสมตามธรรมชาติ ระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* อ้อยพวกนี้มีลำต้นขนาดเล็ก ใบเล็ก ข้อโป่ง มีความหวานสูง เปลือกและเนื้อนิ่ม

4. อ้อยป่านิวกีนี (*S. robustum* Brand. it Jesw. ex Grassl.) เป็นอ้อยป่าแถบเกาะนิวกินี เปลือกแข็ง มีลักษณะลำต้นใหญ่ แข็งแรง อาจสูงถึง 10 เมตร มีความหวานต่ำ

3. โรคอ้อย

โรคอ้อยเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่ง โรคอ้อยเป็นอาการผิดปกติในการเจริญของต้นอ้อยทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา ความผิดปกติอาจเกิดขึ้นที่ราก ลำต้น ใบก็ได้ ซึ่งทำให้อ้อยสูญเสียผลผลิตในแต่ละปีเป็นมูลค่าสูง สาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งเกิดจากเชื้อโรค เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไฟโตพลาสมา ตัวอย่างโรคอ้อยที่พบได้แก่ โรคเหี่ยวเน่าแดง สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Colletotrichum falcatum* โรคลำต้นเน่าแดง สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* โรคแส้ดำ สาเหตุจากเชื้อรา *Ustilago scitaminea* โรคเหี่ยว สาเหตุจากเชื้อรา *Cephalosporium*, *Fusarium* และ *Acremonium* โรคกลิ่นสับปะรด สาเหตุจากเชื้อรา *Ceratocystis paradoxa* โรครากเน่า สาเหตุจากเชื้อรา *Phythium* โรคใบจุดเหลือง สาเหตุจากเชื้อรา *Mycovellosiella koepkei* โรคราสนิม สาเหตุจากเชื้อรา *Puccinia melanocephala* โรคใบลวก สาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas albilineans* โรคใบด่าง สาเหตุจากเชื้อไวรัส โรคใบขาว สาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา โรคกอตะไคร้ สาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา

โรคอ้อยที่สำคัญที่ทำให้อ้อยสูญเสียผลผลิตในแต่ละปีเป็นมูลค่าสูง ส่วนมากมีสาเหตุจากเชื้อรา ได้แก่ โรคลำต้นเน่าแดง และโรคราสนิม

โรคลำต้นเน่าแดง เป็นโรคที่สำคัญในประเทศไทย สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* เชื้อจะเข้าทำลายโดยการสร้างเส้นใยแทงเข้าสู่เซลล์โดยตรง หรือเข้าทำลายทางบาดแผลหรือแผลที่เกิดจากการดูดกินของแมลงปากดูดบางชนิด อ้อยที่เป็นโรคในระยะเติบโตย่างปล้องและระยะอ้อยแก่ เปลือกภายนอกลำต้นเป็นรอยแผลสีน้ำตาลแดง ยอดเหลือง ปล้องเหี่ยวเน่า ทำให้อ้อยตายทั้งต้น เมื่อนำต้นที่เป็นโรคมาผ่าดู ภายในลำต้นจะเป็นสีแดงสลับขาวมีกลิ่นบูด และเมื่อนำไปปลูกทำพันธุ์มักไม่งอก การแพร่ระบาด โดยสปอร์ของเชื้อปลิวมากับลมและฝน และติดไปกับท่อนพันธุ์

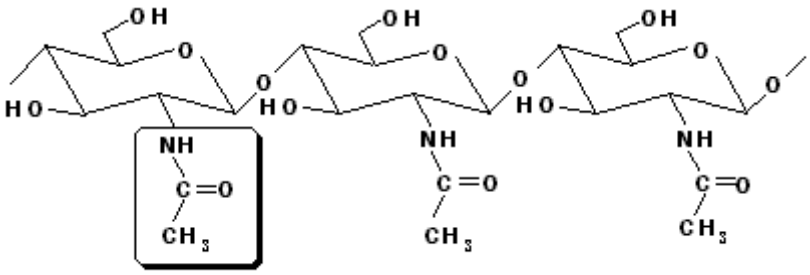
โรคราสนิม สาเหตุจากเชื้อรา *Puccinia melanocephala* เชื้อจะเข้าทำลายโดยงอกเส้นใยเข้าทำลายทางปากใบ มักพบใบแก่มากกว่าใบอ่อน พบในอ้อยอายุ 5 เดือน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว อ้อยที่เป็นโรค เริ่มแรกใบจะเป็นจุดเล็กๆ สีเหลืองอ่อน แผลจะขยายยาวตามเส้นใบ ลักษณะคล้ายสนิมเหล็กจับกระจายทั่วไป ทำให้ใบอ้อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และแห้งตายทั้งใบ ใบตกลู่ลงกว่าปกติ การเจริญเติบโตลดลงจนกระทั่งต้นอ่อนแห้งตายทั้งต้น ต่อมาแผลจะเปลี่ยนเป็นสีดำ

นอกจากนี้แมลงศัตรูอ้อยก็เป็นปัญหาที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตอ้อยลดลง แมลงศัตรูอ้อยที่สำคัญที่ทำความเสียหายได้มากในประเทศไทยได้แก่ หนอนกอลายจุดเล็ก (*Chilo infuscatellus* Snellen.) หนอนกอลายจุดใหญ่ (*Chilo tumidicostalis* Hampsan.) หนอนกอลายใหญ่ (*Chilo sacchariphagus* Bojer.) หนอนกอสีชมพู (*Sesamia inferens* Walker.) หนอนกอสีขาว (*Scirpophaga excerptalis* Walker.) (โอชา ประจวบเหมาะ และคณะ, 2527)

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้สามารถต้านทานโรคและแมลงจะมีส่วนช่วยเพิ่มผลผลิตและลดปัญหาในการใช้สารเคมีกำจัดโรคและแมลง โดยการสร้างสารต่อต้านเชื้อราและแมลงศัตรูอ้อย เช่น เอนไซม์ chitinase เมื่อพืชสัมผัสกับเชื้อราก่อโรค เอนไซม์จะย่อยพอลีแซกคาไรด์ที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อรา และทำให้เซลล์แตกตายในที่สุด

4. ไคติน (chitin)

ไคติน เป็นสารโพลิเมอร์ชีวภาพที่พบมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เปลือกหอย ปู กุ้ง เปลือกของแมลง ผนังเซลล์ของสาหร่าย ยีสต์ และเห็ดรา ไคตินเป็นสารคาร์โบไฮเดรตเช่นเดียวกับแป้งและเซลลูโลสโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆที่เรียกว่า N-acetyl-D-glucosamine มาต่อกันเป็นสายยาวซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในกรดอนินทรีย์ เช่น กรดกำมะถัน กรดเกลือ กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ แต่ไม่ละลายในด่างเจือจาง แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

ที่มา: http://www.daviddarling.info/images/chitin_molecule.jpg

5. ไคทิเนส (Chitinase)

ไคทิเนสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งสามารถย่อยสลายไคทินให้เป็น N-acetylglucosamine อิสระ มีชื่อทางเคมีว่า poly-ß-1,4(2-acetamide-2-deoxy)-D-glucose gycanohydrolase : E.C.3.2.1.1.4 ซึ่งตัดสายยาวของ N-acetylglucosamine ตรงตำแหน่ง ß ภายในสายยาว โดยตัดแบบสุ่ม ซึ่งจะได้สายสั้น ๆของ N-acetylglucosamine เอนไซม์ไคทิเนสมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดและแมลงศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบหลักอยู่ในทางเดินอาหารส่วนต้นของแมลง

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

เทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้เกิดความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ย่นระยะเวลาในการผลิตสายพันธุ์แท้และสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะพึงประสงค์ เช่น สายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพดินเปรี้ยว ดินเค็ม ทนทานต่อโรคและแมลงบางชนิด อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดผลดังกล่าว จำเป็นต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนของอ้อยเกือบทุกส่วนสามารถนำมาเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่น ตาข้าง (Manickasagum, 2004) ใบอ่อน (รงรอง หอมหวน และคณะ, ม.ป.ป. ; Virupakshi *et al*., 2002; Chengalrayan and Gallo-Meacher, 2001) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1961 (Nickell, 1964 อ้างใน ศุภชัย สารกาญจน์, 2527) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรนคิมาจากลำต้นอ้อยพันธุ์ H50-7209 พบว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งเมื่อนำมาแยกเป็นเซลล์เดี่ยวและใช้ nurse culture technique ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ เซลล์สีขาว 1 กลุ่ม เซลล์สีเหลือง 2 กลุ่ม และเซลล์สีเทาแกมแดงอีก 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 5 กลุ่มแตกต่างกันทั้งการเจริญเติบโตและจำนวนโครโมโซม แม้กระทั่งในกลุ่มเซลล์สีเหลืองด้วยกันหรือสีเทาแกมแดงด้วยกัน แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมีโอกาสที่จะสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับอ้อยได้

การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนของอ้อย ขึ้นอยู่กับลักษณะชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ องค์ประกอบของอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงควรมีสมดุลของเกลือแร่ วิตามิน น้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ซึ่งสูตรอาหารที่ต่างกันย่อมมีผลต่อการเกิดแคลลัสและต้นใหม่ที่แตกต่างกันดังรายงานของ จิรวัฒน์ สนิทชน และประสิทธิ์ ใจศิล (2541) รายงานการศึกษาชิ้นส่วนของอ้อยและความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นใบอ่อนให้เจริญเป็นแคลลัส และกระตุ้นให้เกิดต้นอ่อนจากแคลลัสพบว่า เนื้อเยื่อม้วนใบอ่อนส่วนกลางของปล้องสุดท้ายของลำต้นอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่สูง ส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D 2.0-2.5 มก./ล. สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ และหากต้องการให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนและราก ก็สามารถทำได้โดยลดความเข้มข้นของ 2,4-D ให้เหลือ 0.5 มก./ล. พรทิพย์ วงศ์แก้ว (2542) รายงานการเพาะเลี้ยงตาข้างของอ้อย ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. และ BAP 0.5 มก./ล. สามารถกระตุ้นการสร้างต้นอ่อนในอัตรา 20-50 ต้นต่อหนึ่งตาข้าง Chengalrayan and Gallo-Meagher (2001) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของอ้อยลูกผสมพันธุ์ CP 84-1198 ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 13.6 μM สามารถกระตุ้นการเกิดแคลลัสได้ และเมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม thidiazuron (TDZ) สามารถกระตุ้นการเกิดรากได้ดีกว่าสูตรอาหารที่เติม kinetin หรือ NAA

Gallo-Meagher *et al*. (2000) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม thidiazuron (TDZ) สามารถกระตุ้นการเกิดรากได้ดีกว่าสูตรอาหารที่เติม kinetin หรือ NAA

7. การส่งถ่ายยีนสู่พืช

การส่งถ่ายยีนสู่พืช (plant gene transfer) คือ กระบวนการส่งถ่ายยีนที่เราสนใจ เข้าสู่พืช ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นยีนจากพืชเสมอไป อาจเป็นยีนจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็ได้ เช่นอาจเป็นยีนจากแบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น ผลลัพธ์ ทำให้มีการสอดแทรกของยีนเข้าไปในจีโนมของพืช ซึ่งการสอดแทรกของยีนต้องมีความเสถียร โดยสามารถผ่านขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสและไมโอซีส (Walden, 1989 อ้างใน สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) ซึ่งพืชที่ได้รับยีนเข้าไปเรียกว่า พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plants) ในการนำยีนที่สนใจเข้าสู่พืช จะต้องมีพาหะในการที่จะนำยีนที่สนใจเข้าสู่พืช พาหะที่ใช้ส่งถ่ายยีนปัจจุบันมีหลายชนิดเช่น พลาสมิด ในแบคทีเรียหลายชนิด, ดีเอ็นเอของ Lamda phage, Yeast Artificial Chromosome (YAC), ดีเอ็นเอของ Virus หรือ Cosmid เป็นต้น

ในการส่งถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่พืชนั้น ส่วนของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปต้องมีส่วนที่เรียกว่า โปร-โมเตอร์ (promoter) อยู่ในส่วนของยีนนั้นด้วย นอกจากนี้ยังต้องมียีนเครื่องหมาย (selectable marker) และยีนรายงานผล (reporter gene หรือ screenable marker) อยู่ด้วย เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบผลสำเร็จของการส่งถ่ายยีน

โปรโมเตอร์ คือ ช่วงโมเลกุลของ DNA ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป โปรโมเตอร์เป็นบริเวณที่เอนไซม์ RNA polymerase จะเข้ามาเกาะและเริ่มต้นถอดรหัสเพื่อสร้าง mRNA โปรโมเตอร์จะปรากฏอยู่ในส่วนของ nontranscribted DNA ซึ่งอยู่ทางด้าน upstream ของจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส ในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต บริเวณโปรโมเตอร์ จะมีลำดับนิวคลี-โอไทด์ที่จำเพาะ แบ่งเป็น 2 ชุด คือ TATA-box หรือ -25 sequence หรือ Goldberg-Hogness box และ CAAT-box หรือ -75 sequence โปรโมเตอร์ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนอาจเป็นชนิดที่แสดงออกทุกส่วนของพืชและแสดงออกตลอดเวลา (Constitutive promoter หรือ โปรโมเตอร์ของ house keeping gene) เช่น CaMV 35S promoter เป็นโปรโมเตอร์ที่ได้จากเชื้อไวรัสที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบด่างของดอกกะหล่ำ (Cauliflower mosaic virus) หรือแสดงออกเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยสิ่งแวดล้อม (Inducible promoter) เช่น แสงและความร้อน หรือแสดงออกในเนื้อเยื่อใดเนื้อเยื่อหนึ่ง ที่เจาะจงลงไป (Tissue หรือ Organ Specific Promoter) เช่น โปรโมเตอร์ที่แสดงออกที่ผล ใบ ต้น (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) ซึ่งโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้ในการส่งถ่ายยีนสู่พืชนั้นคือ CaMV 35S promoter เป็นโปรโมเตอร์ที่มีคุณสมบัติสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว CaMV 35S promoter ถูกนำมาใช้เป็นโปรโมเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนที่

ส่งถ่ายเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีประสิทธิภาพการแสดงออกต่ำ ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อาจจะมีการเลือกใช้โปโมเตอร์อื่นในการส่งถ่ายยีนที่เพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนที่สูงกว่า CaMV 35S promoter เช่น PEMU Actin 1 (Act 1) และ $\propto$–amylase ในข้าว

ยีนเครื่องหมาย คือ ยีนที่กำหนดลักษณะบางประการที่ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีน โดยไม่ทำให้เกิดอันตรายใด ๆต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ยีนเครื่องหมายที่นิยมใช้คือ ยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เช่น ต้านทานต่อกานามัยซิน (kanamycin resistant) หรือ ยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เช่น bialaphos (bialaphose resistant) ตัวอย่างของยีนเครื่องหมายเช่น

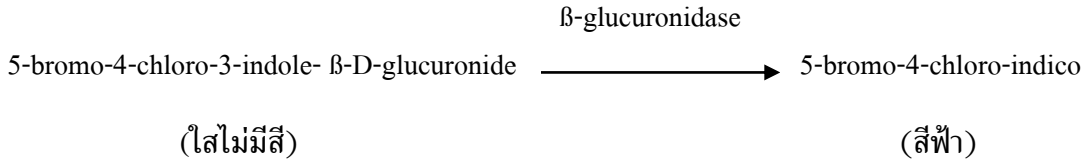
- *npt* II gene ได้จากแบคทีเรีย Tn5 มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase II nptII มีผลยับยั้งการทำงานของ aminoglycoside antibiotic ได้ด้วยกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ตัวอย่างของ aminoglycoside antibiotic ได้แก่ กานามัยซิน เจนตามัยซิน และพาราโนมัยซิน ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อการสร้างโปรตีนโดยจะเกาะกับ 30S ribosomal subunit จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถถอดรหัสและแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนได้และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

- *hpt* gene แยกมาจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (HPT) มีฤทธิ์ต้านทานไฮโกรมัยซินบี (hygromycin B) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม aminoglycoside antibiotic โดยไฮโกรมัยซินจะเกาะกับ binding site ของ elongation factor 2 (EF-2) มีผลยับยั้ง peptide chain elongation ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ เอนไซม์ HPT มีกลไกต้านทานต่อไฮโกรมัยซินด้วยกระบวนการ phosphorylation ให้แก่หมู่ไฮดรอกซิลของไฮโกรมัยซิน (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540)

- *bar* gene และ *pat* gene ได้จาก *Streptomycin hygroscopicus* และ *S. viridochromogenes* มีรหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ phosphinotricin acetlytransferase (*pat*) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของสารกำจัดวัชพืช phosphinotricin (PPT) และ bialaphos ได้ ด้วยปฏิกิริยา acetylation เนื่องจากสาร PPT มีลักษณะคล้ายกับกลูตาเมท จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์กลูตาเมทและส่งผลให้มีการสะสมแอมโมเนียที่เป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

ยีนรายงานผล คือ ยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่และแสดงออกมากน้อยเพียงใด ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใด ยีนรายงานผลที่นิยมใช้ในการส่งถ่ายยีนสู่พืช เช่น beta-glucuronidase (*gus*) gene ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ beta- glucuronidase ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* strain K12 ซึ่งเอนไซม์ beta-glucuronidase จะเปลี่ยน 5-bromo-4-chloro-3-indole-ß-D-glucuronide (x-gluc) ที่เติมลงไป ให้

เป็นสาร 5-bromo-4-chloro-indico ซึ่งมีสีฟ้า ดังนั้นเนื้อเยื่อของพืชที่ได้รับ DNA สายผสมเข้าไป ซึ่งมี *gus* gene อยู่ภายใน DNA สายผสม ก็จะมีสีฟ้า หากมีการแสดงออกของยีน ดังสมการ

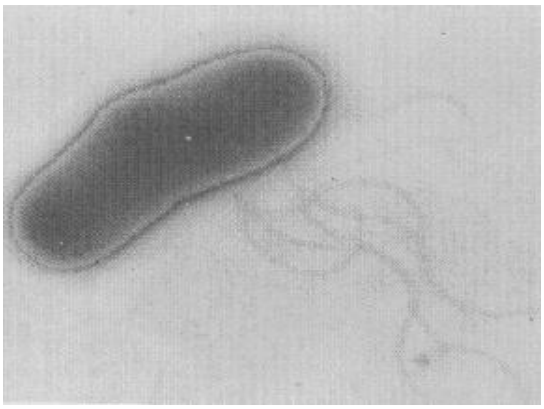


8. การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยใช้ *Agrobacterium*

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่อาศัยอยู่ในดิน จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) หายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria) มีขนาด 0.6-1.0 x 1.0-3.0 µm มีแฟลกเจลลา 1-6 แฟลกเจลลาสำหรับใช้ในการเคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 4) *Agrobacterium* เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ก่อให้เกิดการส่งถ่ายยีนตามธรรมชาติหรือก่อให้เกิดพันธุวิศวกรรมตามธรรมชาติ (Nature's first genetic engineering) *Agrobacterium* มีทั้งหมด 4 ชนิด คือ *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* และ *A. radiobacter* สำหรับ *Agrobacterium* ชนิดที่สำคัญในการส่งถ่ายยีนคือ *A. tumefaciens* และ *A. rhizogenes* โดยภายในเซลล์ *Agrobacterium* มี extrachromosomal plasmid มีขนาดประมาณ 200 กิโลเบส โดยพบว่ามี Ti (tumor inducing) plasmid ที่เป็นสาเหตุทำให้พืชเกิดโรค crown gall tumor ใน *A. tumefaciens* และ Ri (root inducing) plasmid ทำให้พืชเกิดโรค hairy root ใน *A. rhizogenes* สำหรับ Ti plasmid เป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140-235 กิโลเบส พบมาก 2 ชนิด คือชนิดออกโทปีน และโนโปลีน (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) ซึ่ง Ti plasmid จะมีส่วนของ Vir region (Virulence region) ซึ่งมีขนาดประมาณ 35-40 kb มีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T (transfer) DNA เข้าไปในเซลล์พืช T-DNA ซึ่งภายในประกอบด้วย DNA ประมาณ 23 Kb ขอบเขตของ DNA (DNA bordered) กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) ประมาณ 25 bp อยู่สองข้างของ T-DNA ซึ่งเรียกว่า left boder (LB) และ right border (RB) และมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน (ภาพที่ 5) เช่น nopaline synthase (*nos*), agroclinopine synthase (*acs*), octopine synthase (*ocs*) และ agropine synthesis ส่วนอื่นๆ คือ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล (Origin of replication: *ORI*) ซึ่งเป็นส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลาสมิด เมื่อ *Agrobacterium* ส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจะสามารถสร้างสารโอปีนขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน *Agrobacterium* ก็สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากมียีนที่กำหนดการย่อย

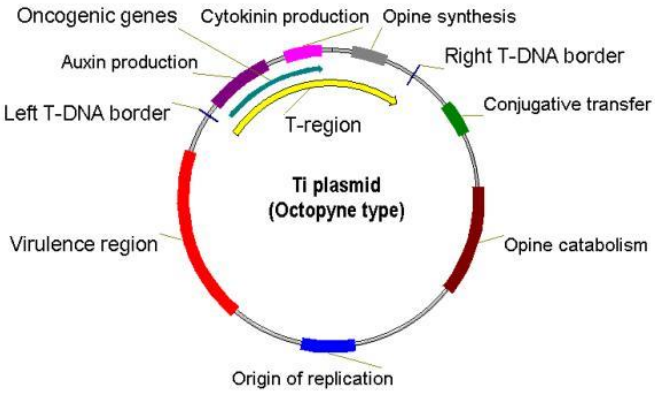
สลายสารโอปีนดังกล่าว เมื่อกำจัด *Agrobacterium* ออกไป พืชจะยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปในเซลล์พืชอย่างถาวร (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543)

ในส่วนของ T- DNA นอกจากจะมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีนแล้ว ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนออกซินและไซโทไคนินด้วย ซึ่งเป็นสาเหตุให้พืชที่ได้รับ T-DNA มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ ยีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่พบคือ tryptophan monooxygenase (*tms 1*), indoleacetamide hydrolase (*tms 2*) และ isopentenyl transferase (*tmr*) สองยีนแรกกำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสาร tryptophan เป็น indoleacetamide และเปลี่ยนต่อไปเป็น indoleacetic acid ซึ่งเป็นสารออกซิน ส่วนยีน *tmr* กำหนดการสร้างเอนไซม์ isopentenyl transferase ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง isopentenyl adenosine ซึ่งเป็นสารพวกไซโตไคนิน ถ้ายีน *tms* เกิดการกลายพันธุ์ จะทำให้เนื้อเยื่อปุ่มปมเกิดการพัฒนาเป็นยอด แต่ถ้ายีน *tmr* เกิดการกลายพันธุ์ เนื้อเยื่อนั้นจะพัฒนาเป็นราก(สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543)



ภาพที่ 4 ลักษณะรูปร่างของ *Agrobacterium*

ที่มา: http:// www.umanitoba.ca/.../39_768/l02/agrios169A.gif



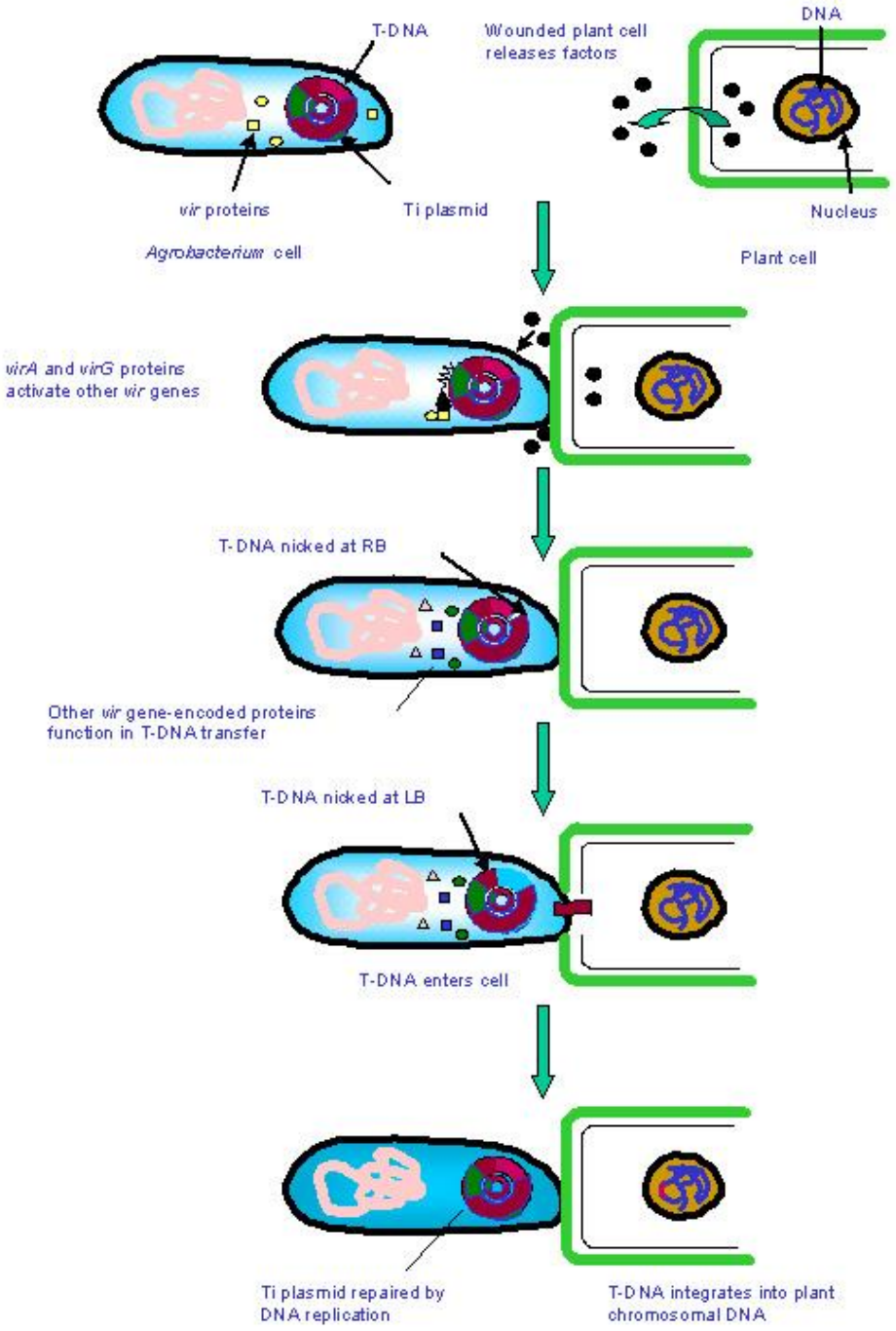
ภาพที่ 5 ลักษณะของ Ti plasmid

ที่มา: http://www.bios.net/.../default/part/ImageData/data

8.1 กลไกการส่งถ่าย T-DNA สู่เซลล์พืช

การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชเกิดขึ้นจากการทำงานของ virulence gene (*vir* gene) และ *chv* gene ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* ขั้นตอนการบุกรุกคือ *Agrobacterium* จะเข้าเกาะที่ตำแหน่งจำเพาะบนเซลล์พืช สารที่เป็นตัวรับรู้ (receptor) ของเซลล์พืชอยู่ที่ผนังเซลล์ ซึ่งคาดว่าอาจจะเป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน จากการศึกษาพบว่า บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* มียีนที่ควบคุมการเข้าเกาะกับเซลล์พืช คือ ยีน chv เมื่อพืชมีบาดแผลจะหลั่งสารฟีนอลลิก เช่น Acetosyringone (4-acetyl-2,6-dimethoxy phenol) ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ *vir* gene มีการแสดงออก คือมีการลอกรหัสและแปลรหัสออกมา โดยมีโปรตีนของ *vir* A ทำหน้าที่เป็น chemoreceptor รับรู้สารประกอบของพืช จากนั้นโปรตีนที่สังเคราะห์จาก *vir* A จะกระตุ้น *vir* G ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุม (regulator component) โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่น ๆในกลุ่ม *vir* D เกี่ยวข้องกับขั้นตอนแรกในกระบวนการขนส่ง T-DNA vir D1 มีคุณสมบัติ topoisomerase activity vir D2 มีคุณสมบัติของ endonuclease activity ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ที่บริเวณ right border (RB) และ left border (LB) ของ T-DNA ทำให้เกิด T-DNA สายเดี่ยว (T-strand) vir C มีส่วนช่วย Vir D1 และ Vir D2 ซึ่งเท่ากับเป็นการส่งเสริมประสิทธิภาพในการส่ง T-strand Vir D2 และ *Vir* E จะเข้าเกาะทางปลาย 5' ของ T-strand ที่ถูกตัดแล้ว เพื่อป้องกัน ไม่ให้เอนไซม์ในกลุ่ม exonuclease และ endonuclease มาย่อยสลาย T-strand ในระหว่างการขนส่งผ่านจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช และทำให้ T-strand อยู่ในรูปเส้นตรง (linear) มีข้อสันนิษฐานว่า *Vir* B กำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำให้ผนังเซลล์ของ *Agrobacterium* เป็นรู ในขั้นตอนตั้งแต่ได้ T-strand จนถึงการขนส่ง T-strand ออกจาก *Agrobacterium* มีลักษณะคล้ายกับกระบวนการ conjugation ของแบคทีเรีย แต่การขนส่ง T-strand ผ่านเซลล์พืชและเยื่อหุ้มนิวเคลียส

ของพืช รวมไปถึงการเข้าไปแทรก (integrate) ของ T-strand ในโครโมโซมพืชจะเหมือนกับการบุกรุกของไวรัส (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การส่งถ่าย T-DNA จากเชื้อ *Agrobacterium* เข้าสู่เซลล์พืช

ที่มา: www.ubn-rrc.ricethailand.go.th

9. การส่งถ่ายยีนสู่อ้อย โดยใช้ *Agrobacterium*

การใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการเช่น ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยการรายงานการศึกษาของ Enriquez-Oregon *et al*. (1998) รายงานการส่งถ่าย *bar* gene ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ phosphinotricin acetyltransferase สู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้ *A. tumefaciens* และตรวจสอบการแทรกสอดของยีนด้วยวิธี Southern analysis พบว่าอ้อยแปลงพันธุ์สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ Manickavasagum *et al*. (2004) รายงานการส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase II (*npt* II) phosphinotricin acetyltransferase (*bar*) และ ß-glucuronidase (*gus*-intron) สู่อ้อยลูกผสม (*Saccharum* species) โดยใช้ *Agrobacterium* strain LBA4404 และ EHA105 พบว่าอ้อยแปลงพันธุ์สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช สำหรับการตรวจสอบความสำเร็จของการส่งถ่ายยีนใช้ GUS assay และการตรวจสอบการแทรกสอดของยีนโดยเทคนิค PCR

10. การส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรง

การใช้ *Agrobacterium* ในการส่งถ่ายยีน เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่ปฏิบัติกันได้ง่ายและราคาถูก แต่มีข้อจำกัดคือ ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวสาลี และข้าวฟ่าง ซึ่งเป็นธัญญาหารที่สำคัญ แม้ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถสร้างพืชใบเลี้ยงเดี่ยวแปลงพันธุ์ จากการใช้ *Agrobacterium* ได้หลายชนิดแล้วก็ตาม แต่ก็ยังมีข้อจำกัดสำหรับพืชบางชนิด ดังนั้นการส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรงจึงถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหานี้ (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2540) การส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรงมีหลายวิธีได้แก่ การส่งถ่ายยีนโดยใช้สาร polyethylene glycol (PEG) การส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation) การส่งถ่ายยีนโดยใช้ microinjection การส่งถ่ายยีนโดย Ultrasonication และการส่งถ่ายยีนโดยใช้ microprojectile หรือ microprojectile bombardment หรือ particle bombardment ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

10.1 การส่งถ่ายยีนโดยใช้ microprojectile หรือ microprojectile bombardment หรือ particle bombardment

เป็นเทคนิคที่พัฒนาโดย J.C. Sanford และคณะ ในปี ค.ศ. 1984 เป็นวิธีการที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธียิงยีนเข้าสู่เซลล์ โดยมีหลักการคือ การนำ DNA เคลือบบนอนุภาคโลหะขนาดเล็ก ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-4 μm เช่นอนุภาคทังสเตนและอนุภาคทองคำ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำ DNA เข้าสู่เซลล์โดยใช้แรงดันของก๊าซประมาณ 300-600 เมตร/วินาที หรือ1,400 ฟุต/วินาที ผลักดันอนุภาคโลหะเข้าสู่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ไปได้เป็นพันอนุภาคต่อการยิงหนึ่งครั้ง (Sanford *et al*., 1987) DNA ที่ส่งถ่ายเข้าไปสอดแทรกกับ DNA ของ

พืช การส่งถ่ายยีนโดยวิธีนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชสำคัญที่ไม่ตอบสนองต่อการส่งถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium* และแก้ไขปัญหาของการส่งถ่ายยีนเข้าสู่โพรโทพลาสต์ จากการที่ไม่สามารถพัฒนากลับเป็นต้นได้ของโพรโทพลาสต์ การส่งถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นการส่งถ่ายยีนที่อาศัยแรงดันจากภายนอกทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช จึงมีปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนมาเกี่ยวข้อง ทั้งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน ได้แก่ แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อเป้าหมาย อายุของเนื้อเยื่อ และสภาพแรงดันภายในเซลล์ รวมถึงปัจจัยทางกายภาพที่ใช้ส่งถ่ายยีน ได้แก่ ชนิดของอนุภาคโลหะที่ใช้ (particle composition) ขนาดของอนุภาค (particle diameter) ปริมาณ DNA ต่อปริมาณอนุภาคที่ใช้ (DNA load per unit mass of particle) อัตราเร็วในการยิง (velocity) เป็นต้น (อภิชาติ วรรณวิจิตร, ม.ป.ป.)

11. การส่งถ่ายยีนสู่อ้อยโดยวิธี particle bombardment

การศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยวิธี particle bombardment เข้าสู่อ้อย เพื่อสร้างอ้อยแปลงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีตามที่ต้องการ โดย Falco *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาการส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase (*neo*) และเอนไซม์ phosphinotricin acetyltransferase (*bar*) สู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้วิธี particle bombardment สามารถสร้างอ้อยแปลงพันธุ์ ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยคัดเลือกอ้อยแปลงพันธุ์ด้วย Geneticin และ kanamycin ตรวจสอบการแทรกสอดของ *neo* และ *bar* gene โดยใช้วิธี Southern analysis ตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ phosphinotricin acetyltransferase และ neomycin phosphotransferase ด้วยวิธี RT-PCR รวมทั้งตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ด้วยวิธี western blotting พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase

12. การสร้างอ้อยแปลงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูอ้อย

การปรับปรุงพันธุ์อ้อย เพื่อให้สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคและแมลงศัตรูอ้อย สามารถใช้เทคโนโลยีชีวภาพได้เช่นกัน โดยการตัดต่อยีนสายจากสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคและแมลงศัตรูอ้อย ซึ่งยีนเหล่านี้จะไม่ปรากฏใน genetic pools ของพันธุ์อ้อยดั้งเดิม ดังนั้นการส่งถ่ายยีนที่ต้านทานดังกล่าวเข้าสู่จีโนมของอ้อยจึงมีความสำคัญ จากการศึกษาพบรายงานการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยครั้งแรกเพื่อให้ต้านทานต่อการบุกรุกของหนอนกอ (stem-borrer) (Arencibia *et al*., 1997) จากการศึกษาต่อมาพบว่ามีระบบที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างพืชและแมลงศัตรูพืชคือ พืชจะมีการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่เพื่อป้องกันหรือต่อสู้กับแมลงศัตรูพืชที่มาบุกรุก และพืชจะผลิตโปรตีนยับยั้ง (proteinase inhibitors; (PIs)) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพ Falco *et al*. (2001) รายงานการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยการส่งถ่ายยีนที่กำหนดการสร้าง PIs เข้าสู่จีโนมของพืช เมื่อพืชได้รับ PIs จะสามารถต่อสู้กับแมลงศัตรูพืชได้ เนื่องจาก PIs จะย่อยแมลงศัตรูพืช โดย PIs จะ

ทำให้แมลงศัตรูพืชขาดกรดอะมิโน ซึ่งเป็นกลไกในการเพิ่มระดับการป้องกันแมลงศัตรูพืชที่เกิดขึ้นในพืช

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคและแมลงศัตรูอ้อย โดยการส่งถ่ายยีนไคทิเนสจากข้าว ซึ่งอ้อยมี ไคทิเนส class I ไคทิเนสกลุ่มนี้จะอยู่ในแวคิวโอล (Broglie and Broglie, 1994 อ้างใน เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, 2548) จึงทำให้อ้อยไม่แสดงความต้านทานต่อโรคถึงแม้ว่าจะพบไคทิเนสในอ้อยก็ตาม จากการที่ไคทิเนสไม่สามารถแสดงออกทำให้พืชไม่ต้านทานต่อโรค จึงมีการศึกษาการคัดเลือกยีนไคทิเนสที่มีประสิทธิภาพแล้วทำการส่งถ่ายยีนสู่พืช โดยใช้โปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพควบคุมการแสดงออกของยีน ได้แก่ cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter