



วารสาร

วิทยาศาสตร์มข.

KKU SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 31 ฉบับที่ 3 (ก.ค. - ก.ย. 46) Vol. 31 No. 3 (Jul. - Sep. '03)





วารสาร

ISSN 0125 - 2364

วิทยาศาสตร์ปู.
KKU SCIENCE JOURNAL**เจ้าของ**

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิชาการในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานทางด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษา และผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก

ปีละ 4 ฉบับ

ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม

ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน

ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน

ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

คำนำเรื่อง ปีละ 75 บาท ข่ายปลีกเล่มละ 20 บาท

การบอกรับเป็นสมาชิก

แจ้งความจำนงค์เป็นจดหมาย หรือกรอกใบสมัครเป็นสมาชิก พร้อมคำนำเรื่องเป็นรณาคติ หรือเช็คไปรษณีย์ในนามของนางบุญคุ้ม เหลือสิน ฝ่ายจัดการส่งจ่าย ป.ท.มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ที่ปรึกษาคณบดีคณะวิทยาศาสตร์
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ**บรรณาธิการ**

มานิตย์ โหมิตระกูล

กองบรรณาธิการ

เฉลิม	เรื่องวิริยะชัย
สมเดช	กนกเมธากุล
ศักดิ์สิทธิ์	จันทร์ไทย
บำรุง	สมสวัสดิ์
วิทยา	อมรกิจบำรุง
ประนอม	จันทร์โนทัย
นฤมล	แสงประดับ
เสาวนิต	ทองพิมพ์
พิสิฐ	เจริญสุดใจ
เที่ยง	ภูมิสะอาด
อำนาจ	มณีศรีวงศ์กุล
บุญทรัพย์	ไวก้า

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิเลน	ดินนรเศรษฐ์
บุญส่ง	ทองสุข

ฝ่ายเศรษฐิก

บุญคุ้ม	เหลือสิน
---------	----------

ฝ่ายจัดการและ**เลขานุการ**

ทัศนีย์	จิตตะกวี
สมศักดิ์	อุ่นจันทิ
สุคนธ์	กลิ่นผกา

บทความและงานวิจัย**ได้รับการกลั่นกรอง****จากผู้ทรงคุณวุฒิ**

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- กระบวนการสร้างแปรงและการวิเคราะห์ลำดับเบส
ของยีนที่กำหนดการสร้างแปรงในข้าว
ปรีชา ประเพทา..... 117

- แนวทางการสร้างพืชทนทาน/ต้านทานต่อสภาพ
ต่าง ๆ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สมพร ประเสริฐส่งสกุล..... 132

งานวิจัย

- Preservation Theorems Concerning
g-Hausdorff and rg-Hausdorff Spaces
Chawalit Boonpok..... 138

- Performance Analysis of Edge Detection
Methods for Macroscopic Images
Hanan H.A. Adlan, Abd Rahman Ramli,
Shattri Mansor and Bachok Taib..... 141

- ☐ An Expert System for Traveling Assistant
(Malaysia Ecotourism)

Asmawati Bt Ayob, Badrah Bt Yussof,
Mohamed Daud, Mohd. Zohadie Bardaie
and Abdul Rashid Mohamed Shariff.....

148

- ☐ ผลของกรดแทนนิกที่ระดับความเป็นพิษเฉียบพลัน
ต่อเหงือก ลำไส้ ตับ และไต ของปลานิล

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, ชุติมา หาญจวนิช,
อำพา เหลืองภิรมย์ และองอาจ เลหาวิณี.....

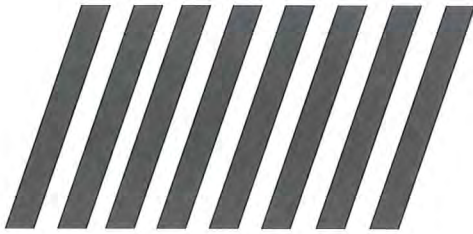
157

- ☐ การส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

โดย *Agrobacterium tumefaciens*

ทศพร พิพัฒน์ภานุกุล, สุนันทิพย์ บุญนาค,
ปิยะดา วีระกุลพิสุทธิ์ และมานิตย์ ไหมยิตตระกุล

167



วิทยาลัยวิทยาศาสตร์
KKU SCIENCE JOURNAL

ISSN 0125 - 2364

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University.

Objectives

1. To promote dissemination of knowledge in all fields of science.
2. To publish research results of faculty, researchers and students.
3. To be a medium for the exchange of knowledge and ideas among faculty, researchers and students of Khon Kaen University and other institutions.

Publishing frequency

KKU Science Journal is a quarterly journal.
Each volume consists of 4 numbers.

Number 1 January - March

Number 2 April - June

Number 3 July - September

Number 4 October - December

Subscription rate

75 baht per annum. Single issue price 20 baht.

Membership

Membership request can be made by letter or by completing the membership form, with the fee paid in the form of a postal order or postal cheque sent to Mrs. Boonkoom Lualon, Managing Staff, Khon Kaen University Post Office, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.

Advisory Committee Dean, Faculty of Science

Associate Dean for Academic Affairs

Editor

Manit Kosittrakun

Editorial Board

Chalerm Ruangviriyachai

Somdej Kanokmedhakul

Saksit Chanthai

Bamrung Somsawadi

Vittaya Amornkitbamrung

Pranom Chantaranothai

Narumon Sangpradub

Soawanit Tongpim

Pisit Chareonsudjai

Tiang Poomsa-ard

Amnuay Maneesriwongkul

Boonsup Waikham

Artists

Kilen Tinnoraset

Boonsong Koungsook

Treasurer

Boonkoom Lualon

Managing Staff

Tassanee Jittakhawee

and Secretary

Somsak Unjantee

Sukhon Klinpaka

All articles published in
KKU Science Journal have been
peer reviewed.

The views and opinions expressed in this journal are those of the author(s), and do not necessarily reflect the views and opinions of the editorial board.

บรรณาธิการ **แฉ**

เรียน ท่านสมาชิกวารสารฯ และท่านผู้อ่านที่รัก

วารสารฯ ปีที่ 31 ฉบับที่ 3 ออกล่าช้ากว่ากำหนด 5 เดือน สาเหตุหนึ่งยังคงเป็นการจัดการเวลาที่ไม่มีประสิทธิภาพของบรรณาธิการ เป็นการยากที่จะขอให้ผู้ทรงคุณวุฒิส่งต้นฉบับของบทความที่ได้รับการพิจารณาแล้ว กลับคืนมายังบรรณาธิการภายในเวลา 3 สัปดาห์ เนื่องจากลำพังเฉพาะภาระงานของผู้ทรงคุณวุฒิก็มากเกินไปอยู่แล้ว นอกจากนี้ผู้เขียนยังใช้เวลาในการแก้ไขปรับปรุงต้นฉบับตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒินานเกินไป จึงทำให้บรรณาธิการไม่สามารถส่งต้นฉบับของวารสารฯ ให้กับทางโรงพิมพ์ได้ตามกำหนดที่ควรจะเป็น โดยปกติแล้วบทความจะได้รับการตีพิมพ์ก่อน-หลังตามเวลาที่ผู้เขียนส่งต้นฉบับมาให้บรรณาธิการ และกองบรรณาธิการพิจารณา แต่ในอนาคตอาจมีการพิจารณาให้บทความที่ผู้เขียนแก้ไขปรับปรุงแล้วเสร็จก่อนได้รับการตีพิมพ์ก่อน

สวัสดีครับ

บรรณาธิการ

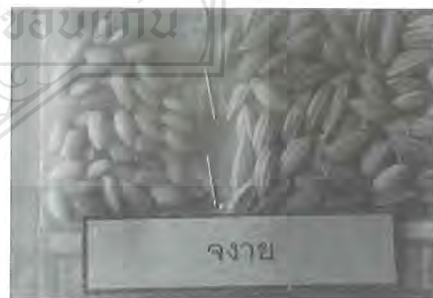
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กระบวนการสร้างแป้งและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ที่กำหนดการสร้างแป้งในข้าว

ปรีชา ประเทพา¹

แป้ง (starch) เป็นรูปแบบหนึ่งของคาร์โบไฮเดรตที่ถูกเก็บสะสมตามส่วนต่างๆ ของพืช เซลล์ของพืชสีเขียว มีออร์แกเนลล์ชนิดหนึ่งเรียกว่า คลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการนี้คือน้ำตาล ดังนั้นจะพบน้ำตาล (sugar หรือ saccharide) ในเนื้อเยื่อพืชในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน น้ำตาลที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส หรือ ฟรุคโทส พบได้ในผลไม้ ในน้ำผึ้งพบทั้งกลูโคสและฟรุคโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส พบในดินอ้อย เกิดจากการรวมกันของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโทส ชนิดละ 1 โมเลกุล ในเซลล์พืชมีออร์แกเนลล์ที่ใช้เป็นที่สร้างน้ำตาลจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงคือคลอโรพลาสต์ ซึ่งจะมีน้ำตาลและแป้งสะสมอยู่ชั่วคราว เนื้อเยื่อพืชที่มีคลอโรพลาสต์เหล่านี้อยู่เรียกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่สะสมแป้ง (assimilatory tissue) นอกจากคลอโรพลาสต์แล้วในเนื้อเยื่อพืชยังพบออร์แกเนลล์อีกชนิดหนึ่งคือเอมิโลพลาสต์ (amyloplast หรือ leucoplast) ซึ่งเป็นที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์แป้งและมีการสะสมแป้งแบบถาวร เนื้อเยื่อที่มีเอมิโลพลาสต์อยู่และทำหน้าที่สะสมแป้งเรียกว่าเนื้อเยื่อสะสม (storage tissue หรือ storage organ) ตัวอย่างเช่น เอ็นโดสเปิร์มของข้าวก็เป็นเนื้อเยื่อที่มีการสะสมแป้งเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการงอกของเมล็ด ก่อนการสะสมแป้ง จะมีกระบวนการสร้างแป้ง (starch synthesis) จากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเสียก่อน

ในข้าวนั้นกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลส่วนมากเกิดขึ้นที่ใบโดยเฉพาะอย่างยิ่งใบธง (flag leaf) และน้ำตาลจะถูกลำเลียงลงมาสร้างเป็นแป้งที่เอมิโลพลาสต์ที่อยู่ในเซลล์ของเนื้อเยื่อเอ็นโดสเปิร์ม กระบวนการสะสมแป้งในเซลล์ของเอ็นโดสเปิร์มนั้นเริ่มปรากฏชัดในวันที่ 6 หลังการออกดอก โดยเมล็ดแป้งเริ่มปรากฏให้เห็นในเอมิโลพลาสต์และหลังจากการออกดอกได้ 10 วัน แป้งจะกลายเป็นส่วนประกอบหลักของเซลล์ของเนื้อเยื่อเอ็นโดสเปิร์ม และในช่วงเวลานี้มวลเคลือบของเมล็ดจะสลายไป การรวมตัวของโมเลกุลของแป้งทำให้เกิดโครงสร้างใหม่ที่เรียกว่า เม็ดแป้ง (starch granule) และเม็ดแป้งจำนวนมากมายมหาสารรวมกันเป็นโครงสร้างสุดท้ายของพืชที่สะสมแป้ง เช่น เมล็ดสะสมแป้งในธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี เป็นต้น หรือรากสะสมแป้งหรือหัวสะสมแป้ง (tuber) ซึ่งได้แก่ หัวมัน ลำปะหูลัง มันฝรั่ง เป็นต้น (รูปที่ 1)

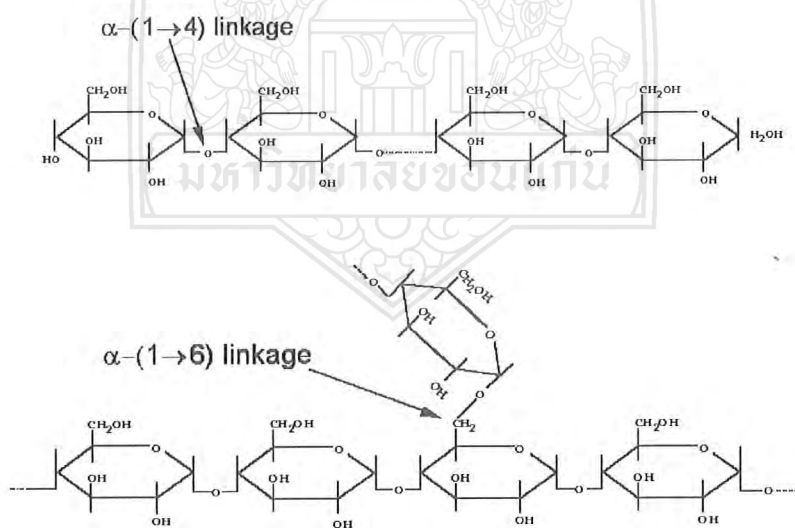


รูปที่ 1 ตัวอย่างพืชในกลุ่มธัญพืชที่สะสมแป้งในรูปแบบของเมล็ด (grain) รูปนี้เป็นเมล็ดข้าวพันธุ์จางของชนเผ่าทางวัฒนธรรมที่อยู่ภาคเหนือของไทย

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.เมือง จ.ขอนแก่น 44000

แป้งแบ่งตามโครงสร้างได้ 2 ชนิด คือ อะมิโลสและอะมิโลเพกทิน แป้งสองชนิดนี้ได้จากกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากน้ำตาลชนิดหนึ่งคือ ซูโครส โดยกระบวนการสร้างแป้ง ซึ่งจะกล่าวถึงโดยละเอียดต่อไป โดยแป้งทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นสายยาวที่เชื่อมต่อกันด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (glucose polymer) ซึ่งลักษณะของสายกลูโคสที่ต่อกันแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สายยาวที่มีกิ่งก้านเรียกว่า อะมิโลเพกทิน และสายยาวที่ไม่มีกิ่งก้านเรียกว่าอะมิโลส (รูปที่ 2) อะมิโลสประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 และไม่มีกิ่งก้านสาขา ทำให้มีโครงสร้างเป็นสายเดี่ยวที่เป็นเกลียว (single helix) อะมิโลเพกทินประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสที่จับต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 ทำให้เกิดเป็นสายหลักของโมเลกุลกลูโคสและมีการแตกกิ่งของโมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันโดยใช้พันธะ α -1, 6 อะมิโลสมีอยู่ประมาณ 20-30 % ของแป้งที่สะสม แต่ไม่มีความจำเป็นในการสร้างโครงสร้างของเม็ดแป้ง โมเลกุลของแป้งที่มีบทบาทหลักในการสร้างเม็ดแป้งคืออะมิโลเพกทิน

ขั้นตอนของการสร้างเม็ดแป้งโดยการจัดเรียงตัวของโมเลกุลอะมิโลสและอะมิโลเพกทินนั้นเป็นกระบวนการที่ต้องผสมผสานและมีขั้นตอนที่ซับซ้อน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างอะมิโลส คือ ADP glucose pyrophosphorylase (ADPase) และ granule-bound starch synthase (GBSS) เป็นกระบวนการที่ไม่ซับซ้อน แต่ในกระบวนการสร้างอะมิโลเพกทินนั้นเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องถึง 4 ชนิด คือ ADPase, soluble starch synthase (SS), starch branching enzyme (BE) และ starch debranching enzyme (DBE) ดังนั้นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นในการสังเคราะห์อะมิโลเพกทินนั้นเกิดขึ้นในลักษณะที่เรียกว่า ปฏิกิริยาแบบผสมผสาน (concerted reactions) เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ แต่ละชนิดยังแบ่งออกได้หลายรูปแบบ (isoform) แต่ละรูปแบบเข้าร่วมปฏิกิริยาการสร้างแป้งอะมิโลเพกทินในขั้นตอนที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของแป้งอะมิโลส (บน) และอะมิโลเพกทิน (ล่าง)

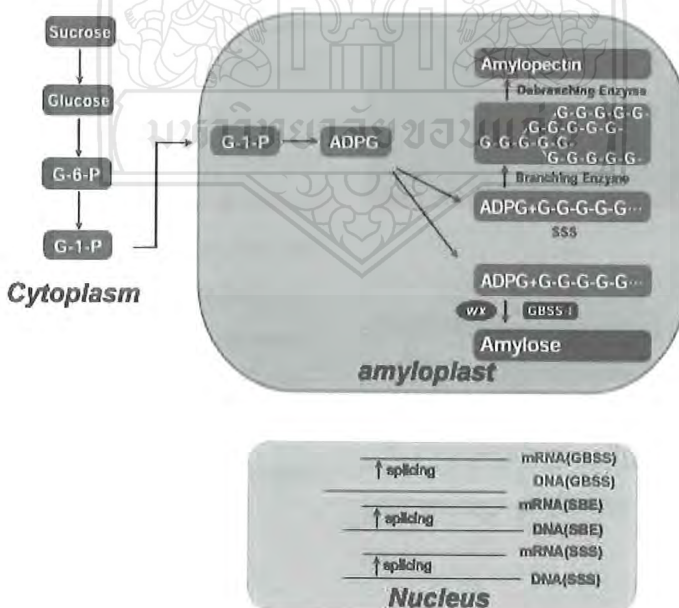
กลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic mechanism) ในกระบวนการสร้างแป้ง มี 5 ขั้นตอน ดังนี้

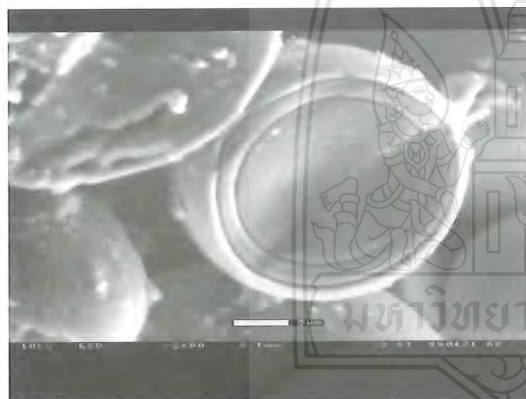
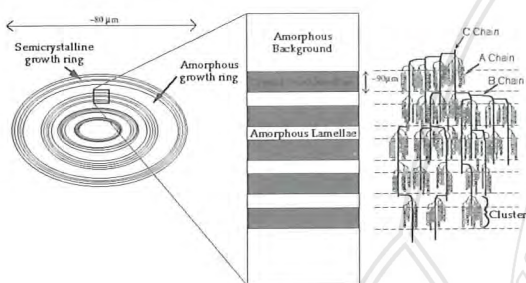
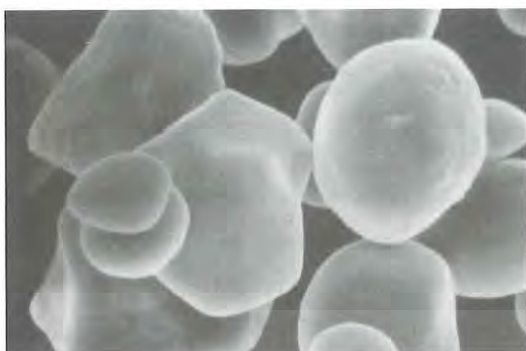
1. สร้าง ADP glucose หรือ glucosyl-nucleotide substrate ซึ่งใช้เป็นขั้นตอนในการสร้างแป้ง ใช้เอนไซม์ ADPG glucose pyrophosphorylase (AGPase)
2. เริ่มสร้างสายพอลิเมอร์สายสั้นๆ ที่ยังไม่กิ่งก้าน (unbranched maltodextrins) ใช้เอนไซม์ soluble starch synthase (SS)
3. สร้างให้สายพอลิเมอร์ยาวขึ้นโดยใช้ขั้นตอนที่ต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 ใช้เอนไซม์ soluble starch synthase (SS) และเอนไซม์ GBSS
4. สร้างกิ่งก้านของพอลิเมอร์โดยใช้ขั้นตอนที่ต่อจากพอลิเมอร์สายหลักด้วยพันธะ α -1,6 ใช้เอนไซม์ starch branching enzyme (SBE)
5. การปรับแต่ง (trimming) โครงสร้างและการจัดระเบียบโมเลกุลอะมิโลเพกทินเพื่อสร้างเป็นเม็ดแป้ง ใช้เอนไซม์ starch debranching enzyme (DBE)

โมเดลสำหรับใช้ในการอธิบายการสังเคราะห์อะมิโลเพกทินในเอนโดสเปิร์มของข้าว

ในปี ค.ศ. 2002 ศาสตราจารย์ ยาซุนรินากามูระ ได้เสนอโมเดลการสร้างโมเลกุลของอะมิโลเพกทินโดยเรียกโมเดลนี้ว่า “การสร้างกิ่งก้านสองขั้นตอนและการกำจัดกิ่งก้านที่ไม่เหมาะสม” โมเลกุลของอะมิโลเพกทินมีโครงสร้างที่เกิดจากการรวมกันของกลุ่มลูกโซ่หลายกลุ่มที่ร้อยเรียงกัน (cluster structure) (รูปที่ 3) กลุ่ม cluster เหล่านี้จะรวมกันเป็นโครงสร้างพื้นฐาน (building block) ที่ก่อรูปกลายเป็นเม็ดแป้ง อะมิโลเพกทิน 1 โมเลกุล เกิดจากการรวมกันของ cluster จำนวนมาก และมีแขนง (chain) ที่ให้สัญลักษณ์เป็น A, B หรือ C ซึ่งอะมิโลเพกทิน 1 โมเลกุลจะมีเพียงแขนง C เพียงแขนงเดียว

แผนภาพสรุปขั้นตอนการสร้างแป้ง





รูปที่ 3 เม็ดแป้ง (starch granule) ของข้าวโพด (บน) และแผนภาพแสดงโครงสร้างภายในของเม็ดแป้งที่ประกอบขึ้นจากโมเลกุลของอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน (กลาง) และภาพถ่ายแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเม็ดแป้งที่ขยายขนาดในรูปแบบรัศมี สังเกตวงแหวนการเจริญ (growth ring) (ล่าง)

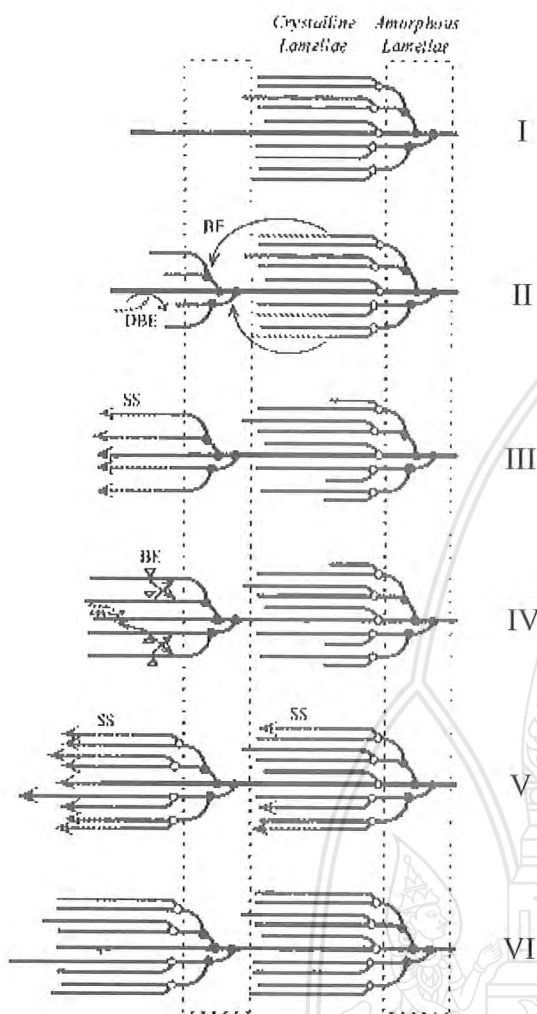
โมเดลที่เสนอโดยศาสตราจารย์ ยาซุโนรินากามูระ (Nakamura, 2002) อธิบายได้ดังนี้ (ดูรูปที่ 4 ประกอบ)

ขั้นตอนที่ 1

1. จากภาพที่ 4I เป็นโครงสร้างของ cluster 1 cluster ที่ได้สร้างเสร็จแล้ว จะสังเกตเห็นชั้น 2 ชั้นที่แยกกันอย่างชัดเจน คือ amorphous lamellae (AL) และ crystalline lamellae (CL) ชั้น AL ประกอบด้วยแขนง C, B1 และ B2 ส่วนชั้น CL ประกอบด้วยแขนง A

2. เมื่อมีการสร้าง cluster ต่อไปนั้น cluster ใหม่ที่จะถูกสร้างโดยการใช้แขนงที่เป็นแกนกลางซึ่งอาจได้มาจากแขนงที่ยาวที่สุดของ cluster ก่อนหน้านี้ หรืออาจใช้แขนง B2 ก็ได้ ขั้นตอนนี้ใช้เอนไซม์ BE ในปฏิกิริยาการลำเลียงน้ำตาลกลูโคสจากแขนง A ที่ยาวที่สุดใน cluster ก่อนหน้านี้หรืออาจใช้แขนง A ที่อยู่ใกล้กันของ cluster อื่น ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาคือ BEI ส่วนเอนไซม์ BEIa และ BEIb มีบทบาทในบางกรณีเท่านั้น (รูปที่ 4 II) และให้สังเกตด้วยว่ามีเอนไซม์ DBE เข้าร่วมในปฏิกิริยาด้วยโดยการเข้าไปตัดแขนง B ที่มีตำแหน่งไม่เหมาะสมออกไป เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้จะได้ชั้น AL ที่มีเฉพาะแขนง B เท่านั้น

3. ขั้นตอนต่อไปเป็นการสร้างแขนง A ให้ยาวออกไปซึ่งแขนง A พบเฉพาะในชั้น CL เท่านั้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ soluble starch synthase (SS) และ debranching enzyme (DBE) เอนไซม์ SS ใช้ในปฏิกิริยาการสร้างแขนง A ให้ยาวออกไปโดยนำโมเลกุลของกลูโคสมาต่อกันทีละโมเลกุลให้ยาวออกไปจนถึงความยาวของแต่ละ cluster ที่ควรจะเป็น รูปแบบของเอนไซม์ SS ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้คือ SSIII และ SSI รวมทั้ง SSIIa ด้วย (รูปที่ 4III)



รูปที่ 4 โมเดลที่แสดงขั้นตอนการสร้างโมเลกุลอะมิโลเพกทินในเอนโดสเปิร์มของข้าว (Nakamura, 2002)

ขั้นตอนที่ 2

1. เมื่อแขน A ถูกสร้างจนมีความยาวถึงระดับของการต่อเป็นสายยาว (degree of polymerization หรือ DP) เท่ากับ 12 หรือมากกว่า เอนไซม์ BEIIb ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาการสร้างแขนทวิจำนวนเพิ่มขึ้นภายในพื้นที่อันจำกัดคือเฉพาะบริเวณ CL ในขณะที่เอนไซม์ DBE มีบทบาทในการขจัดแขนงที่เกิดในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมออกไป (รูปที่ 4IV) หลังจากนั้นเอนไซม์ SSIIa มีบทบาทสนับสนุนในปฏิกิริยาการ

สร้างแขน A ให้ยาวขึ้น และเอนไซม์ SSI ก็มีบทบาทในกระบวนการต่อแขน A ให้ยาวขึ้นด้วย จนในที่สุดจะได้ cluster ที่สมบูรณ์ โดยให้สังเกตว่ากิ่งคือบริเวณ $\infty-1, 6$ อยู่ในชั้น AL (วงกลมดำ) และอยู่ในชั้น CL (วงกลมขาว) ของแต่ละ cluster

ในเมื่อดึงมืองค์ประกอบทั้งอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน จากรายละเอียดของกระบวนการสร้างโมเลกุลของอะมิโลเพกทินนั้นแสดงให้เห็นว่ามีความซับซ้อนและโมเลกุลของแป้งชนิดนี้เป็นโครงสร้างหลักของเม็ดแป้ง ส่วนโมเลกุลของแป้งอะมิโลสมีลักษณะเป็นเกลียวของสายเดี่ยว และสอดคล้องอยู่ระหว่างโมเลกุลของอะมิโลเพกทินในบริเวณชั้น AL

IV ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ BE, SS และ DBE ในกระบวนการสังเคราะห์อะมิโลเพกทิน

ในกระบวนการสร้าง cluster ของอะมิโลเพกทินนั้นเป็นบทบาทของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (SS, BE และ DBE) โดยรูปแบบที่เสนอโดยศาสตราจารย์ชาวญี่ปุ่นท่านนี้แสดงให้เห็นว่าการเริ่มต้นสร้างกิ่งหรือแขนง (branch-formation process) จะเกิดขึ้นก่อน และตามมาด้วยการสร้างความยาวของกิ่งหรือแขนง (chain-elongation process) ดังนั้นบทบาทของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ต้องมีการจัดบทบาทของตัวเองให้เกิดภาวะสมดุลของกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด ปฏิกริยาเคมีการสร้าง cluster มีรายงานว่าถ้ากิจกรรมของเอนไซม์ BEIIb มีมากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SSIIa และกิจกรรมของเอนไซม์ DBE จะส่งผลทำให้โครงสร้างละเอียดของอะมิโลเพกทินเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมทำให้อะมิโลเพกทินที่ได้มีความสามารถละลายน้ำได้มากกว่าและมีกิ่งก้านมากกว่าปกติ ในขณะเดียวกันถ้าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ BEIIb ในข้าวที่ใช้ทดลองพบว่าจำนวนกิ่งในชั้น CL ลดจำนวนลงแต่ทุกๆ กิ่งมีความยาวสมบูรณ์แสดงว่าขนาดของ cluster มีความคงที่แม้ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีการลดลงในกระบวนการสร้างเมื่อเทียบกับกิจกรรม

ของเอนไซม์ในระดับปกติ ในขณะที่เดียวกันความสมดุลระหว่างเอนไซม์ BE และ DBE ก็มีส่วนสำคัญ กล่าวคือเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะต้องแสดงออกในระดับที่พอดี ในระหว่างกระบวนการสร้าง cluster

แม้ว่าได้มีคำอธิบายเกี่ยวกับกระบวนการสร้างโมเลกุลของอะมิโลเพกทินในระดับหนึ่งที่พอมองภาพได้ชัดเจนว่ามีขั้นตอนและปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นได้อย่างไรนั้น อย่างไรก็ตามก็ยังคงมีคำถามที่ต้องค้นหาคำตอบสำหรับโมเดลที่เสนอโดยศาสตราจารย์ นากามูระ ดังนี้

1. อะไรคือตัวกำหนดความยาวของแต่ละ cluster ที่ทำให้แต่ละ cluster มีความยาวแตกต่างกัน
2. แขนง B2 (B2 chain) ถูกสร้างขึ้นได้อย่างไร เมื่อ cluster ใดๆ ถูกสร้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว แขนง 1 แขนงคือ B1 และ/หรือ A จะถูกเลือกให้เป็นแขนง B2 สำหรับ cluster ต่อไป หรือแขนง B2 และ B3 ถูกสร้างขึ้นก่อน หรือแขนง B2 และ B3 ถูกสร้างขึ้นอย่างอิสระโดยไม่พึ่งพาแขนงของ cluster อื่น
3. ปัจจัยอะไรที่จำกัดจำนวนแขนงของ cluster
4. แขนง A และ B1 เปลี่ยนแปลงมาจากที่ใด
5. อะไรคือกลไกของปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแขนง การสร้างแขนงให้ยาวขึ้น (chain elongation) และการตัดแต่งกิ่งของแขนง (debranching)
6. เอนไซม์อื่นๆ เช่น disproportionating enzyme, phosphorylase และ amylase เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อะมิโลเพกทินอย่างไร
7. malto-oligosaccharide ถ้ามีบทบาทจะมีบทบาทอย่างไรในกระบวนการสร้างอะมิโลเพกทิน
8. ในระหว่างการสังเคราะห์แป้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างไร

คำถามเหล่านี้เป็นสิ่งที่ท้าทายสำหรับนักวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งต้องทำการวิจัยเพื่อแสวงหาคำตอบที่ชัดเจน ต้องอาศัยนักวิจัยหลากหลายสาขา เช่น พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา ชีวเคมี เป็นต้น การรายงานผลการศึกษาที่ทยอยออกมาจากนักวิจัยเหล่านี้จะคลี่คลายปัญหาที่ต้องการคำตอบแม้ว่าจะใช้เวลายาวนานเพียงใดก็ตาม

รหัสพันธุกรรมของยีนที่กำหนดการสร้างแป้ง

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่าเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แป้งมีอยู่ 4 ชนิด คือ GBSS, BE, SS และ DBE เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่ถูกกำหนดโดยยีนที่อยู่ในนิวเคลียส และมีการแปลรหัสเป็นเอนไซม์ในไซโทพลาซึมแล้วต่อมาจะถูกส่งไปที่เอมิโลพลาสต์หรือคลอโรพลาสต์ ซึ่งการขนส่งเอนไซม์เหล่านี้จากไซโทพลาซึมไปยังเอมิโลพลาสต์หรือคลอโรพลาสต์จำเป็นต้องใช้โปรตีนขนส่ง (transit peptide sequence) ในเอนโคสเปปไทด์ของข้าวมีเอนไซม์อยู่ 4 ชนิด และแต่ละชนิดมีรูปแบบต่างๆ ดังนี้

1. GBSS มีรูปแบบเพียง 1 รูปแบบ คือ GBSSI
2. BE (หรือ SBE) มีรูปแบบต่างๆ ที่มีรายงานคือ BEI, BEIIa, BEIIb
3. SS (หรือ SSS) มีรูปแบบดังนี้คือ SSI, SSIIa, SSIIb, SSIIIa, SSIIIb
4. DBE มีรูปแบบดังนี้คือ isoamylase และ pullulanase

บทความในส่วนนี้จะวิเคราะห์ลำดับเบสของ genomic DNA ของยีนกำหนดการสร้างแป้งอะมิโลส และอะมิโลเพกทิน ที่มีรายงานผลการศึกษาและมีข้อมูลลำดับเบสที่เก็บไว้ที่ GenBank รวม 3 ยีนเพื่อให้เห็นข้อมูลที่แสดงให้เห็นถึง “ธรรมชาติ” ของยีนในบริบทของการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SSI

ยีนที่กำหนดการสร้าง starch soluble enzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างแป้งอะมิโลเพกทินนั้นในข้าวมี 2 รูปแบบแต่มีรายงานว่ายีนในรูปแบบ SSI มีบทบาทมากที่สุดโดยวัดได้จากการแสดงออกของยีนนี้ในเนื้อเยื่อพืชส่วนที่

เรียกว่าเอนโดสเปิร์ม การวิเคราะห์ยีน SSI ในข้าว ในบทความนี้จะใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก ผลจากการศึกษาของ Tanaka et al. (1995) ซึ่ง ลำดับเบสของยีนนี้มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ของ NCBI ภายใต้รหัส D38221 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ยีน SSI ที่พบในข้าวมีขนาด 7.4 kb ลำดับเบสทั้งหมดของยีนประกอบด้วย 15 exons และ 14 introns จุดเริ่มต้นของแปลรหัส (start codon) อยู่บน exon1 ที่ตำแหน่งเบส 1154 และรหัสยุติอยู่บน exon15 ที่ตำแหน่ง 121 (นับจากเบสเริ่มต้นของ exon 15) คือเอ็นเอบริเวม exon1 มีลำดับเบสที่กำหนดกรดอะมิโนของโปรตีนขนส่ง (transit peptide) ซึ่งตัวต้นแบบเอนไซม์ SSI นั้นต้องใช้โปรตีนขนส่งสำหรับเป็นสัญญาณบ่งชี้หรือใช้เป็นเป้าหมายในกระบวนการขนส่งโปรตีนต้นแบบที่จะกลายเป็นเอนไซม์ SSI (หรือต้นแบบเอนไซม์ SSI) ไปยังแอมิโลพลาสต์ และคลอโรพลาสต์ แผนภาพของยีน SSI ในข้าวแสดงดังภาพต่อไปนี้ (บริเวณที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมคือ exon ส่วนที่เป็นเส้นตรงอยู่ระหว่างรูปสี่เหลี่ยมคือ intron)



การแปลรหัส

โดยทั่วไปแล้วการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนนั้นสิ้นสุดในแต่ละ exon กล่าวคือ ในแต่ละ exon จำนวนนิวคลีโอไทด์ถูกแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนสอดคล้องกัน เช่น ใน exon หนึ่งมีขนาด 90 bp จะแปลรหัสได้กรดอะมิโน 30 หน่วย แต่ในกรณีของยีน SSI (รวมทั้งยีนอื่นๆด้วย) จะมีความแตกต่างจากที่กล่าวไปแล้วดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสรุปได้ดังนี้ (ดูตารางที่ 1 ประกอบคำอธิบาย)

1. exon 1 มีเบสสิ้นสุด (ปลาย 3') คือ G ต้องไปเชื่อมต่อกับส่วนต้น (ด้าน 5') ของ exon 2 ที่เป็นเบส GT ได้เป็น codon GGT ที่กำหนดกรดอะมิโนชนิด lysine

2. exon 4 มีเบสสิ้นสุด (ปลาย 3') คือ GT ต้องไปเชื่อมต่อกับเบส C ของตอนต้น (ปลาย 5') ของ exon 5 ได้เป็น codon GTC ที่กำหนดกรดอะมิโนชนิด valine

3. exon 7 มีเบสสิ้นสุด (ปลาย 3') คือ G ต้องไปเชื่อมต่อกับเบส GA ของตอนต้น (ปลาย 5') ของ exon 8 ได้เป็น codon GGA ที่กำหนดกรดอะมิโนชนิด lysine

4. exon 11 สิ้นสุด (ปลาย 3') ด้วยเบส GG ต้องเชื่อมต่อกับเบส T ของตอนต้น (ปลาย 5') ของ exon 12 ได้เป็น codon GGT ที่กำหนดกรดอะมิโนชนิด glycine

5. exon 13 สิ้นสุด (ปลาย 3') ด้วยเบส GG ต้องเชื่อมต่อกับเบส G ของตอนต้น (ปลาย 5') ของ exon 14 ได้เป็น codon GGG ที่กำหนดกรดอะมิโนชนิด glycine

6. exon 14 สิ้นสุด (ปลาย 3') ด้วยเบส G ต้องเชื่อมต่อกับเบส GC ของตอนต้น (ปลาย 5') ของ exon 15 ได้เป็น codon GGC ที่กำหนดกรดอะมิโนชนิด lysine

exon 15 มีขนาด 652 bp จะถูกแปลรหัสเพียง 108 bp ได้กรดอะมิโนจำนวน 36 หน่วย อะมิโนตัวสุดท้ายคือ valine ที่กำหนดโดย codon GTA ต่อจาก codon GTA เป็น stop codon คือ TGA

ตารางที่ 1 ลำดับเบสรอยต่อระหว่าง exon กับ intron ของยีน SSI และกรดอะมิโนที่แปลรหัสได้

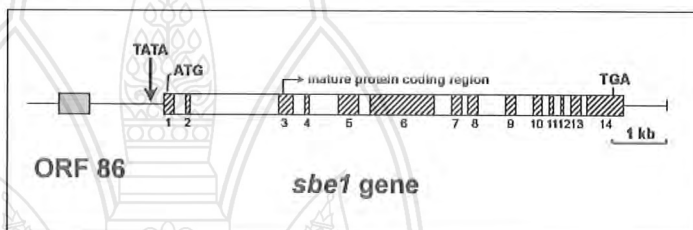
Exon				Intron			Exon		
Term	Size	Sequence	Donor	Term	Size	Phase class ^a	Acceptor	Sequence	Term
	(bp)								
1	411	GATCTAGAAG Asp Leu Glu G	gtacgtgg	A	907	1	gcattcag	GTCTCACAGA lyLeuThrGl	2
2	356	TGTTGATTGG rValAspTrp	gtgagtat	B	657	0	ctgttcag	GTGTTTGTTG ValPheValA	3
3	78	CGATAATCAG yAspAsnGln	gtattctt	C	87	0	tactgcag	TTCAGATACA PheArgTyrT	4
4	125	TTGTGCCAGT euValProVa	gtatgttc	D	835	2	ttatccag	CCTTCTTGCT lLeuLeuAla	5
5	82	AGCACATCAG uAlaHisGln	gtttgagc	E	96	0	tgtgatag	GGTGTGGAGC GlyValGluP	6
6	174	TGTCAGCCAG rValSerGln	gtgagatt	F	189	0	attaccag	GGGTATTCAT GlyTyrSerT	7
7	82	GTATTGAATG ValLeuAsnG	gtacctat	G	96	1	atatgtag	GAATTGTAAA lyIleValAs	8
8	92	GTCCGGAAAG uSerGlyLys	gtgaagta	H	110	0	atgtttag	GCCAAGTGTA AlaLysCysL	9
9	63	TGTGCCTCTG pValProLeu	gttagata	I	78	0	atttacag	ATTGGCTTTA IleGlyPheI	10
10	90	TATTCAATTC nIlegInPhe	gtaagttc	J	663	0	tgttatag	GTCATGCTTG ValMetLeuG	11
11	125	TAAGTGCAGG leThrAlaGl	gtatgcaa	K	124	2	ttgtacag	TTGCGATATA yCysAspIle	12
12	109	AGGCCTCAGA yGlyLeuArg	gtaagctt	L	81	0	ttcaacag	GATACAGTGG AspThrValG	13
13	53	AGGGTACAGG lnGlyThrGl	gtaaggaa	M	135	2	tattgcag	GTGGGCATTC yTrpAlaPhe	14
14	41	AATGCTGTGG AsnAlaValG	gtaagttt	N	830	1	tcttgcag	GCATTGCGGA lyIleAlaAs	15
15	652	CAAGTGTCAA							

* phase classes, 0 = ไม่มีการสอดแทรกของ intron ที่ตำแหน่งใดๆของเบสบน exon, 1 = มีการสอดแทรกของ intron ที่เบส
ตัวสุดท้ายของ exon นั้นๆ, 2 = มีการสอดแทรกของ intron ที่ 2 เบสสุดท้ายของ exon ใดๆ (ที่มา: Tanaka et al., 1995)

5' splice donor site และ 3' splice acceptor site ของ intron ของยีน SSI

ยีน SSI ประกอบด้วย intron จำนวน 14 intron ซึ่งมีขนาดตั้งแต่เล็กที่สุด คือ intron 9 มีขนาด 78 คู่เบส intron ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ intron1 มีขนาด 907 คู่เบส

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' splice donor site และ 3' splice acceptor site พบว่า ทั้ง 14 intron ทั้ง 2 บริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) กล่าวคือ ลำดับเบสด้านปลาย 5' splice donor site คือ GT และลำดับด้านปลาย 3' splice acceptor site คือ AG จึงส่งผลทำให้กระบวนการตัดต่อ exon เข้าด้วยกันจึงไม่เกิดปัญหาเหมือนกันกับยีน GBSS1 ซึ่งเบสบริเวณ 5' splice acceptor site ของ intron1 เปลี่ยนแปลงโดยการเกิดมิวเทชันจาก GG ไปเป็น GT ทำให้ไม่สามารถตัดต่อ exon ของยีน GBSS เป็นไปได้อย่างสมบูรณ์ดังที่จะกล่าวต่อไป



การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน starch branching enzyme (SBE)

Kawasaki et al. (1993) ได้ศึกษา SBE ในข้าวและรายงานว่ายีนนี้มีอยู่ 2 รูปแบบ คือ SBEI และ SBEII โดย SBEI (เหมือนกับ SBEI ในข้าวโพด) จะแสดงออกในปริมาณมากเฉพาะในอวัยวะคือในเมล็ดที่กำลังเจริญและแสดงออกได้มากที่สุดในช่วงเวลา 7-15 วันหลังจากข้าวออกดอก ซึ่งการแสดงออกของยีน SBEI จะเกิดขึ้นพร้อมกันกับยีน GBSS ยีน SBEI มีขนาดของ full-length cDNA เท่ากับ 2.8 kb

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SBEI ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (accession number D10838) พบว่ายีนนี้มีขนาด 8.5 kb เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ cDNA ของยีนเดียวกันนี้พบว่า ยีน SBEI ประกอบด้วย 14 exons และ 13 introns โดย

intron 2 มีขนาดใหญ่ที่สุด (2212 bp) ซึ่งคุณสมบัตินี้พบในยีนที่กำหนดการสร้างแป้งของข้าวทุกาณ (GBSS และ SS) บริเวณ exon1, exon2 และส่วนต้น (ปลาย 5') จะกำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่ง (transit peptide) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีขนาดที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 65 หน่วย ส่วนโปรตีนที่กำหนดโดยยีน SBEI ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์จะมีรหัสเริ่มต้นของการแปลรหัส คือ ATG อยู่ถัดไปจากโคดอนสุดท้ายของโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งดังกล่าว (ดูภาพข้างล่างประกอบ) บริเวณที่เป็นรหัสเปลี่ยนคือ exon ส่วนที่เป็นเส้นตรงอยู่ระหว่างรหัสเปลี่ยนคือ intron จำนวนเบสทั้งสิ้นที่มีการแปลรหัสเท่ากับ 2460 bp ได้กรดอะมิโนจำนวน 820 หน่วย

ชนิดเบสของรอยต่อระหว่าง exon และ intron นั้นพบว่า ลำดับเบสที่ยาว (consensus sequences) ของ intron ทั้งหมด คือ 5' GT...AG3' ซึ่งเป็นไปตามกฎของ "GT...AG" ของยูคาริโอตที่เสนอโดย Breathnach and Chambon (1981) ทำให้กระบวนการตัดต่อ RNA เกิดขึ้นตามปกติ ทำให้ได้ mRNA ที่สามารถกำหนดชนิดของกรดอะมิโนของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ครบถ้วน (ตารางที่ 2)

รหัสพันธุกรรมที่อยู่บน SBE mRNA นั้น การแปลรหัสจะได้โปรตีน 2 แบบ คือ โปรตีนขนส่งและโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ โคดอนเริ่มต้นของโปรตีนขนส่งอยู่ที่ exon 1 ของยีนนี้ ส่วนโคดอนเริ่มต้นของโปรตีนที่เป็นเอนไซม์จะอยู่ที่ exon 3 และจะแปลรหัสแต่ละโคดอนเป็นกรดอะมิโนไปจนตลอดสายและสิ้นสุดที่โคดอน TGA ที่อยู่บน exon 14

ตารางที่ 2 เบลบริวณรอยต่อระหว่าง introns กับ exon ของยีน SBEI ในข้าว

Intron number	Exon/	Intron	/Exon
		(bp)	
1	GAATCGCG	GTCAGTCA.....86...GTCCGCAG	GGCGGGGG
2	CTGGAAAG	GTAAGATA...2196...ATTCAAAG	GTCAAGAC
3	TTCTAAAG	GTTAAGTT.....99...TTTTGTAG	GCTATTTG
4	GCTGCACA	GTAAGTTC....418...GCATATAG	AGAAGCAC
5	TGTGAAAG	GTCCTCTA.....92...CCTTACAG	GTACGTGT
6	ATGATCAG	GTATATAG....296...TTTTTCAG	TCCATTGT
7	TCCAAAAG	GTTATTTT....141...TATTTTCAG	ATGATTCA
8	GCAATGAG	GTAATATC....421...TCTTTTAG	TTTGGCCA
9	GATACAAG	GTTGTGCC....452...TTGAACAG	TATATGAA
10	AAGATAAG	GTAATGGC....149...CTTTTCAG	GTTATTGT
11	TACAAGGG	GTAATAA.....65...ATGTGAAG	TTACAAAG
12	ATGGAAGA	GTAAGCAG....101...TACCACAG	GTTGGCCA
13	CCTGTGTG	GTAAAGTC.....66...ACTATCAG	GCTTACTA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยังขาด (consensus sequence) ที่ปลาย 5' และ 3' ของ intron ระบุด้วยการขีดเส้นใต้ (ที่มา: Kawasaki et al., 1993)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน GBSS

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนนี้โดยใช้ข้อมูลของยีน GBSS ที่มีอยู่ใน GenBank (accession number AF031162) พบว่า waxy gene ประกอบด้วยดีเอ็นเอบริเวณที่เป็น exon จำนวน 14 exon และดีเอ็นเอส่วนที่เป็น intron จำนวน 13 intron ยีนนี้กำหนดการสร้างเอนไซม์ GBSS เอนไซม์ชนิดนี้

เรียกชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า waxy protein มีขนาดโมเลกุลประกอบด้วย กรดอะมิโน 609 หน่วย ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอส่วนที่ใช้เป็นต้นแบบของการแปลรหัส (หรือ mRNA) มีความยาว 1,827 bp แผนภาพของยีนนี้แสดงดังภาพต่อไปนี้ การจัดระบบของยีน GBSS ในข้าว บริเวณที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมคือ exon ส่วนที่เป็นเส้นตรงอยู่ระหว่างรูปสี่เหลี่ยมคือ intron



ตารางที่ 3 ลำดับเบสของรอยต่อระหว่าง exons กับ introns และกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน SBEI

Exon				Intron				Exon	
Term	Size (bp)	Sequence	Donor	Term	Size	Phase class	Acceptor	Sequence	Term
1	120	GGAATCGCG G l y I l e A l a	gtcagta	A	102	0	gtccgcag	GGCGGGGGTG G l y G l y G l y G	2
2	63	GCCTGGAAG t P r o G l y L y s	gtaagata	B	2212	0	attcaaag	GTCAAGACCA V a l L y s T h r A	3
3	208	TTTTCTAAAG P h e S e r L y s G	gttaagtt	C	115	1	ttttgtag	GCTATTTGAA l y T y r L e u L y	4
4	70	CTGCTGCACA r o A l a A l a G l	gtaagttc	D	434	2	gcatatag	AGAAGCACAG n G l u A l a G l n	5
5	270	CCTGTGAAAG l a C y s G l u A r	gtcctcta	F	108	2	ccttacag	GTACGTGTTT g T y r V a l P h e	6
6	907	CCATGATCAG r H i s A s p G l n	gtatatga	G	312	0	tttttcag	TCCATTGTTG S e r I l l e V a l G	7
7	117	ACTCCAAAAG a L e u G l n L y s	gttatttt	H	157	0	tatttcag	ATGATTCACT M e t I l l e H i s P	8
8	63	GGGCAATGAG t G l y A s n G l u	gtaatatc	I	437	0	tcttttag	TTTGGCCATC P h e G l y H i s P	9
9	108	TCGATACAAG u A r g T y r L y s	gttgtgcc	J	468	0	ttgaacag	TATATGAATG T y r M e t A s n A	10
10	102	GAAAGATAAG u L y s A s p L y s	glaatggc	K	165	0	cttttcag	GTTATTGTCT V a l l l e V a l P	11
11	68	CTTACAAGGG h r T y r L y s G l	gtaactaa	L	81	2	taccacag	TTACAAAGTC y T y r L y s V a l	12
12	81	GCCATGGAAG l y H i s G l y A r	gtaagcag	M	118	2	taccacag	GTTGGCCATG g L e u A l a M e t	13
13	117	TCCCTGTGTG a l P r o V a l T r	gtaaagtc	N	81	2	actatcag	GGCTTACTAT p A l a T y r T y r	14
14	458	CTGCAAA TGA* p C y s L y s							

* โคดอนหยุด (stop codon) (ที่มา : วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ลำดับเบสของยีน SBEI ที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank acc. no. D10838)

ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ GBSS มีอยู่ 2 อัลลีลส์ คือ อัลลีล a (Wx^a) และอัลลีล b (Wx^b) โดยอัลลีล a มีการแสดงออกของยีนมากกว่าอัลลีล b ประมาณ 10 เท่า โดยวัดจากปริมาณของโปรตีน waxy (หรือเอนไซม์ GBSS) อัลลีล a จะมีเบสที่เป็นเบสเริ่มต้นของ intron1 เป็น G ในขณะที่เบสเริ่มต้นของอัลลีล b คือ T (ดูภาพด้านบนประกอบ) ซึ่งการแสดงออกของอัลลีล a มากกว่าอัลลีล b เป็นผลสืบเนื่องจากการเกิดมิวเทชันของเบสดังกล่าวนี้อาจ G ไปเป็น T

รายละเอียดของกลไกการแสดงออกของ waxy gene ที่เบสตำแหน่งเริ่มต้นของ intron 1 ที่เปลี่ยนแปลงจาก G เป็น T ซึ่งเป็นบริเวณรอยต่อระหว่าง Exon 1 กับ Intron 1 (the 5' splice site) โดยเบสเริ่มต้นของ Intron 1 ในพันธุ์ข้าวกลุ่มอะมิโลสปานกลางและสูงจะมีเบสชนิด G (GGTATA) พันธุ์ข้าวที่มีเบส G เรียกว่าอัลลีล a (Wx^a) ซึ่งถือว่าเป็น wild-type allele พันธุ์ข้าวที่มีอะมิโลสต่ำจะมีเบสชนิด T (GTTATA) ข้าวกลุ่มนี้จะมีอัลลีล b (Wx^b) เป็นความโศกคดีของชนชาวเอเชียที่มีพันธุ์ข้าวกลุ่มนี้ที่เมื่อหุงสุกแล้วจะนุ่มเหนียว โดยอัลลีล b เกิดขึ้นโดยธรรมชาติจากการเกิดการผ่าเหล่า หรือมิวเทชัน (mutation) จากเบส G ไปเป็นเบส T การเปลี่ยนแปลงเบสจาก G ไปเป็น T ส่งผลทำให้กลไกของการแสดงออกของยีนที่มีอัลลีล b มีระดับการแสดงออกลดลง เมื่อเทียบกับพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีล a ซึ่งกลไกระดับโมเลกุลผลจากการศึกษาดังที่ได้กล่าวถึงในตอนต้นแล้วนั้นสรุปได้ว่า การที่อัลลีล b แสดงออกได้น้อยกว่าอัลลีล a เนื่องจากพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีล b มี GBSS mRNA 2 แบบ คือ แบบที่มีความสมบูรณ์ และแบบที่ผิดปกติ GBSS mRNA แบบที่สมบูรณ์นั้นมีขนาด 2.3 bp ซึ่งในกระบวนการตัด intron ออกไปและต่อ exon เข้าด้วยกันเป็นไปโดยสมบูรณ์ ส่วน GBSS mRNA แบบที่ไม่สมบูรณ์นั้นเกิดจากการตัด intron 1 ออกไปไม่ได้และยังคงติดอยู่กับ exon ของยีนนี้ที่ต่อกันตามลำดับ ดังนั้นทำให้เซลล์มีส่วนส่วนของ GBSS mRNA ที่สมบูรณ์น้อย

ทำให้มีปริมาณการแสดงออกของยีนได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวที่มี GBSS mRNA แบบสมบูรณ์ทั้งหมดในเซลล์ของพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลางและสูง

การแปลรหัส

การแปลรหัสเป็นโปรตีน GBSS ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์นั้น เริ่มต้นที่ exon 2 ซึ่งโคดอนเริ่มต้น คือ ATG จะอยู่บริเวณนี้ และการแปลรหัสสิ้นสุดที่ด้านปลาย 5' ของ exon 14 บริเวณโคดอนหยุด คือ TGA แสดงดังภาพด้านบน รายละเอียดของการแปลรหัสมีดังต่อไปนี้ (คำว่า phase class = 0, 1 และ 2 ให้ดูตารางที่ 3 ประกอบด้วย)

ลำดับเบสบน exon 1 ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน

การแปลรหัสเริ่มต้นที่โคดอนเริ่มต้น ATG ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 38 ที่เป็นเบสแรก (A) ของโคดอนเริ่มต้นของ exon 2 จำนวนเบสที่ถูกแปลรหัสรวม 339 เบส ได้กรดอะมิโนรวม 133 หน่วย และการแปลรหัสจะดำเนินต่อไปคือจาก exon 3 ไปถึง exon 5 ซึ่งผลจากการแปลรหัสจะมีความลงตัวกล่าวคือจำนวนเบสจะสอดคล้องกับจำนวนกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัส กรณีเช่นนี้เรียกว่า "phase 0"

Exon 6 ซึ่งมีความยาวของเบสเท่ากับ 64 เบสนั้น ผลจากการแปลรหัสจะใช้เพียง 63 เบส ได้กรดอะมิโนจำนวน 31 หน่วย เบสที่เหลืออยู่ด้านปลาย 3' คือ G กรณีเช่นนี้เรียกว่า "Phase 1"

Exon 7 มีขนาด 101 เบส การแปลรหัสใน exon 7 นั้นจะเริ่มต้นจากโคดอน GGT โดยเบส G เป็นเบสจากตอนปลาย 3' ของ exon 6 ทำให้การแปลรหัสในช่วงนี้จะใช้เบสจำนวน 102 เบส ทำให้ได้กรดอะมิโนจำนวน 34 หน่วย

Exon 8 มีขนาด 110 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 36 หน่วย และเหลือเบสอีก 2 เบส คือ GG กรณีนี้เรียกว่า "Phase 2" ซึ่งจะไปรวมกับเบสเริ่มต้นของ exon 9 คือ เบส G ได้เป็นโคดอน GGG

Exon 9 มีขนาด 244 เบส ซึ่งเบสแรกของ exon 9 คือ G และรวมกันกับเบส GG ของส่วนปลาย 3' (ดังที่กล่าวแล้ว) ได้เป็น ขนาด 246 เบส แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 82 หน่วย

Exon 10 มีขนาด 177 เบส แพลรหัสได้ กรดอะมิโนจำนวน 59 หน่วย

Exon 11 มีขนาด 212 เบส แพลรหัสได้ กรดอะมิโนจำนวน 70 หน่วย เหลือเบสอีก 2 เบส คือ CG (Phase 2)

Exon 12 มีขนาด 87 เบส รวมกับเบส CG ของปลาย 3' ของ exon 11 ได้ขนาด 89 เบส แพลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 29 หน่วย เหลือเบสอีก 2 เบส คือ AC (Phase 2)

Exon 13 มีขนาด 129 เบส รวมกับเบส AC ได้ขนาด 131 เบส แพลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 43 หน่วย ทำให้เหลืออีก 2 เบส คือ AG (Phase 2)

Exon 14 มีขนาด 370 เบส แต่ใช้แพลรหัสเพียง 244 เบสและรวมกับเบส AG ของปลาย 3' ของ exon 13 รวมเป็นขนาดที่ใช้แพลรหัสเท่ากับ 246 เบส ได้กรดอะมิโนจำนวน 82 หน่วย

ตารางที่ 4 เบสบริเวณรอยต่อระหว่าง introns กับ exons ของยีน GBSS ในข้าว

Intron number	Exon/	Intron (bp)	/Exon
1	ATCTGCAAG	G*TATACA...1107...CAATTCAG	TGCAGAGA
2	GCCATGGCT	GTAAGCAC.....99....CTTTGCAG	GCGAATGG
3	GTGGCTGAG	GTAGGAGC....101...CATTGCAG	ATCAAGGT
4	CTGGAGAAG	GTGGAGTC....80....GATTTTCAG	GTTTGGGG
5	TTTTGCCAG	GTCAGTGA...83...ACCTGCAG	GCAGCACT
6	GAACCTCTG	GTGAGTTA....76....GACAACAG	GTGAGGAT
7	AATGCAAAG	GTCTATGC....74....CACTGCAG	GTTGCTTT
8	CATCGACGG	GTATGAGT....105...AATTTTCAG	GTATGACA
9	GCAACCACG	GTAAGAAC....101...AATTTTCAG	GCAATCGA
10	GTTCTTCTG	GTATAATA....228...TGTTTCAG	GGTACTGG
11	TACGGAACG	GTATACAA.....90...TTCTCCAG	CCCTGTGC
12	AGCGTCGAG	GTAAGCCT....93....TTTGGCAG	TGCAAGGT
13	TCCTGGAAG	GTATAAAT.....341..GATTTTCAG	GGGCCTGC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยังคง (consensus sequence) ที่ปลาย 5' และ 3' ของ intron ระบุด้วยการขีดเส้นใต้

* เบสที่ตำแหน่งนี้มี 2 ชนิด คือ G และ T ข้าวแต่ละพันธุ์จะมีอย่างใดอย่างหนึ่ง

(ที่มา: วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของ GenBank acc. no. AF031162)

ยีนสำคัญที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสร้างแป้งในเมล็ดข้าวนั้น มีอยู่ 3 ยีน คือ GBSS, SS และ SBE จากผลการวิเคราะห์ยีนทั้งสามยีนและการตรวจเอกสาร พบว่ากระบวนการตัดต่อ RNA หรือ RNA splicing นั้นพบว่าไม่มีรายงานที่พบความผิดปกติของการตัดต่อ exon แต่อย่างใดในยีน SS และ SBE ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอส่วนที่เป็น intron ทั้งสองยีนนี้พบว่าเบสเริ่มต้น (ปลาย 5') และลำดับเบสสิ้นสุด (ปลาย 3') เป็นดังนี้คือ 5' - GT...AG-3/ ทุก intron ของยีนทั้งสอง ซึ่งลำดับเบสนี้เป็นลำดับเบสยั้งยวดของ intron ที่ทำให้การตัดต่อ exon ไม่มีความผิดปกติ เบสเริ่มต้น GT และเบสตอนปลายของ intron นี้ เรียกว่า splice donor site และ splice acceptor site ตามลำดับ ส่วนในยีน GBSS ซึ่งมี 13 intron พบว่า 12 intron มีลำดับยั้งยวดดังกล่าว ยกเว้นใน intron1 ที่เบสเริ่มต้นของ splice donor site เป็น TT ส่งผลทำให้ไม่สามารถตัด intron 1 ออกไปได้โดยสมบูรณ์ทำให้ได้ mRNA GBSS มีส่วนของ intron1 ติดอยู่ทำให้การแสดงออกของยีนแตกต่างไปจากปกติที่ splice donor site เป็น GT ผลที่ตามมาคือพันธุ์ข้าวเจ้าที่มี splice donor site แบบ TT นี้มีปริมาณอะมิโลสต่ำในเมล็ด (< 19%) รวมทั้งพันธุ์ข้าวเหนียวด้วย

การวิจัยยีนควบคุมการสังเคราะห์แป้ง:

การเริ่มต้นวิจัยยีนอื่น ๆ ในข้าวไทย

ข้าวเป็นอาหารที่ให้พลังงานซึ่งคิดเป็นแคลอรีที่ให้แก่ชาวโลกมากกว่าพืชทุกชนิด พื้นที่ปลูกข้าวครอบคลุมไม่น้อยกว่าร้อยละ 10 ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดที่มีอยู่บนพื้นโลก ข้าวเป็นพืชอาหารหลักชนิดเดียวที่ให้หลักประกันความมั่นคงด้านอาหาร ความมีเสถียรภาพทางสังคม ข้าวเป็นส่วนหนึ่งของประวัติศาสตร์ของชาติไทยรวมทั้งประเทศในแถบเอเชียในแง่วัฒนธรรม และความเป็นอัตลักษณ์ของชาติ ความสำคัญของข้าวจึงเป็นสิ่งที่มนุษย์มีความพยายามศึกษาวิจัยในแง่มุมต่างๆ ที่เกี่ยวกับข้าวมาตั้งแต่อดีต

จนถึงปัจจุบัน แม้ว่าในปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของข้าว (rice genome) เป็นผลสำเร็จแล้วก็ตาม ยุคหลังจีโนม (post-genomic era) ยังต้องดำเนินต่อไป การศึกษาค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับยีนของข้าวได้ทวีความเข้มข้นขึ้น ยีนที่คาดว่ามิโนจีโนมข้าวมากถึง 30,000 ยีน ที่ถูกค้นพบในข้าวจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดว่าพบยีนอะไรบ้างและพบในพันธุ์ข้าวพันธุ์อะไร เป็นพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในไทยหรือไม่ พันธุกรรมข้าวในเมืองไทยที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยยีนต่างๆ นั้น ได้มีการศึกษาวิจัยจนพบว่ายีนต่างๆ ที่มีอยู่ในยีนพูลของข้าวไทยนั้นแตกต่างไปจากข้าวที่มีต้นกำเนิดจากส่วนอื่นๆ ของโลกอย่างไร ยีนที่พบในข้าวไทยนำไปสู่การจดสิทธิบัตรยีนมีกี่ยีนแล้ว สิ่งเหล่านั้นเป็นประเด็นสำคัญที่นักวิทยาศาสตร์ด้านข้าวต้องปรับเปลี่ยนกระบวนการทัศน์ใหม่ (paradigm shift) ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยข้าวที่สำคัญคือผู้ประเมินโครงการวิจัยยีนของข้าว ยังใช้กระบวนการทัศน์เดิมๆ ที่เป็นอยู่ทั้งผู้วิจัยและผู้ประเมินโครงการวิจัย ยีนของข้าวไทยอาจถูกนักวิทยาศาสตร์ต่างชาตินำไปจดสิทธิบัตรยีน แล้วจะตอบคำถามของอนุชนรุ่นหลังได้อย่างไรว่า ทำไมเหตุการณ์เช่นนั้นจึงเกิดขึ้นแล้วซ้ำเล่าดังเช่นเหตุการณ์อื่นๆ ที่คนรุ่นแล้วรุ่นเล่าที่สร้างขึ้นเป็นมรดกให้คนรุ่นหลังมาแก้ปัญหา

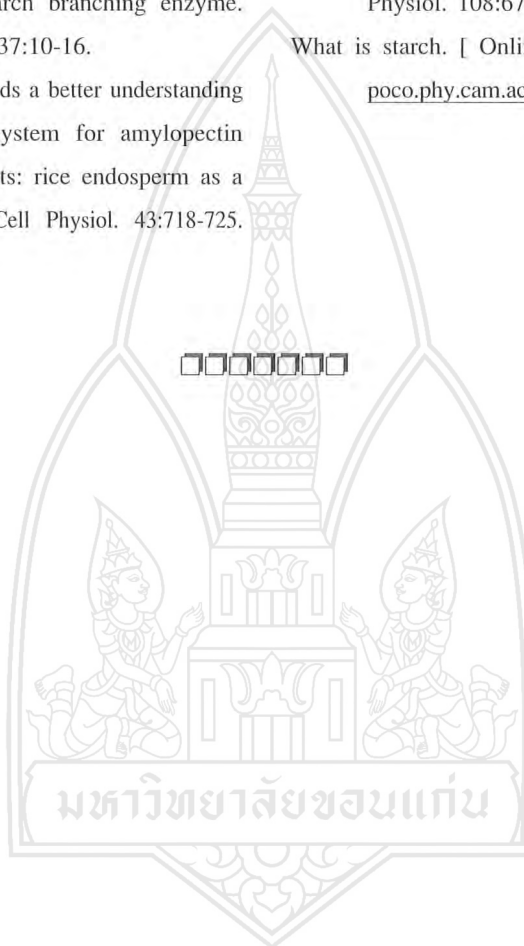
กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยเกี่ยวกับยีนควบคุมการสังเคราะห์แป้งในข้าวจนทำให้สามารถนำข้อมูลบางส่วนที่ได้จากการตรวจเอกสารและการวิจัยนำมาเขียนบทความนี้ได้

บรรณานุกรม

- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50:349-383.

- Frances, H., Bligh, J., Larkin, P.D., Roach, P.S., Jones, C.A., Fu, H. and Park, W.D. (1998). Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties. *Plant Mol. Biol.* 38:407-415.
- Kawasaki, T., Mizuno, K., Baba, T. and Shimada, H. (1993). Molecular analysis of the gene encoding a rice starch branching enzyme. *Mol. Gen. Genet.* 237:10-16.
- Nakamura, Y. (2002). Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol.* 43:718-725.
- Smith, A.M., Denyer, K. and Martin, C. (1997). The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:67-87.
- Tanaka, K.-I., Ohnishi, S., Kishimoto, N., Kawasaki, T. and Baba, T. (1995). Structure, organization, and chromosomal location of the gene encoding a form of rice soluble starch synthase. *Plant Physiol.* 108:677-68.
- What is starch. [Online]. Available: <http://www.poco.phy.cam.ac.uk/research/starch/whatis.htm>



แนวทางการสร้างพืชทนทาน/ต้านทานต่อสภาพต่าง ๆ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สมพร ประเสริฐสูงสกุล¹

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย และมีการเผยแพร่โดยทั่วไป ซึ่งถือว่าไม่ใช่เป็นเรื่องใหม่นัก แต่ก็ถือว่ามีความสำคัญ และมีรายละเอียดบางประการที่ควรทราบ การเกษตรในประเทศไทยปัจจุบันมีการแข่งขันกันสูง มีการผลิตพันธุ์พืชที่มีคุณภาพดี มีลักษณะเด่น เป็นที่ต้องการของตลาด ไม่ว่าจะเป็นไม้ดอกไม้ผล ไม้ยืนต้น เช่น การผลิตส้มเปลือกหอม สามารถนำส่วนของเปลือกไปแปรรูปเป็นอาหารต่าง ๆ หรือการผลิตพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคและแมลง ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ แนวทางเลือกหนึ่งเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวสามารถอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (explant) หรืออาจหมายถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะในอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ สภาพการเพาะเลี้ยงอาจชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) ในอาหารแข็ง หรือเลี้ยงในอาหารเหลวให้อยู่ในสภาพที่เรียกว่า เซลล์แขวนลอย (cell suspension) เนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถเจริญไปเป็นต้นพืชได้ โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า ออแกโนเจนซิส (organogenesis) ซึ่งหมายถึง การเจริญของต้นและรากอย่างเป็นอิสระต่อกัน หรืออาจจะผ่านกระบวนการที่เรียกว่าเอมบริโอเจนซิส (embryogenesis) ซึ่งเป็นการเจริญที่มีลักษณะคล้ายกับเอมบริโอ โดยมีการเจริญของต้น

และรากไปพร้อม ๆ กัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมได้ในอัตราที่สูง เรียกว่า somaclonal variation ซึ่งมีสาเหตุจากสิ่งต่าง ๆ ต่อไปนี้ คือ

1. การแปรผันเนื่องมาจากสาเหตุของพันธุกรรมของพืช
2. การแปรผันเนื่องมาจากสาเหตุทางชีวเคมีภายในเนื้อเยื่อพืช
3. การแปรผันเนื่องมาจากการชักนำ

โดยปกติการปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้โดยใช้วิธีการผสมพันธุ์และคัดเลือกลักษณะที่ดีซึ่งเกิดขึ้น เมื่อใช้การคัดเลือกจากการแปรผันในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร จะใช้ระยะเวลาสั้น และใช้พื้นที่น้อยกว่า จึงเป็นข้อดีของการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคนี้ ตัวอย่างสาเหตุของการแปรผันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เห็นได้ชัดเกิดจากปัจจัยหลายประการ เช่น เกิดจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งอาจไปก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ การตอบสนองของพืชต่อความเครียด (stress) ที่มีการเหนี่ยวนำในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ยังหมายรวมถึงการรวมโปรโทพลาสต์ (protoplast fusion) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ สามารถรวมโปรโทพลาสต์ของพืชต่างชนิดกันโดยไม่ต้องอาศัยเพศ ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ประโยชน์จากการคัดเลือกลักษณะที่ดีของเซลล์พืชซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาของการเพาะเลี้ยงอยู่บ้าง หากไม่สามารถชักนำให้เกิด

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
อ.เมือง จ.ปัตตานี 94000

เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งทำให้ไม่สามารถได้ต้นพืชที่สมบูรณ์มาเพาะปลูกต่อไปได้ แต่ก็ยังมีรายงานการประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีจากการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในด้านต่าง ๆ คือ

1. การคัดเลือกพืชทนเค็ม
2. การคัดเลือกพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช

แนวทางคัดเลือกพืชทนเค็ม

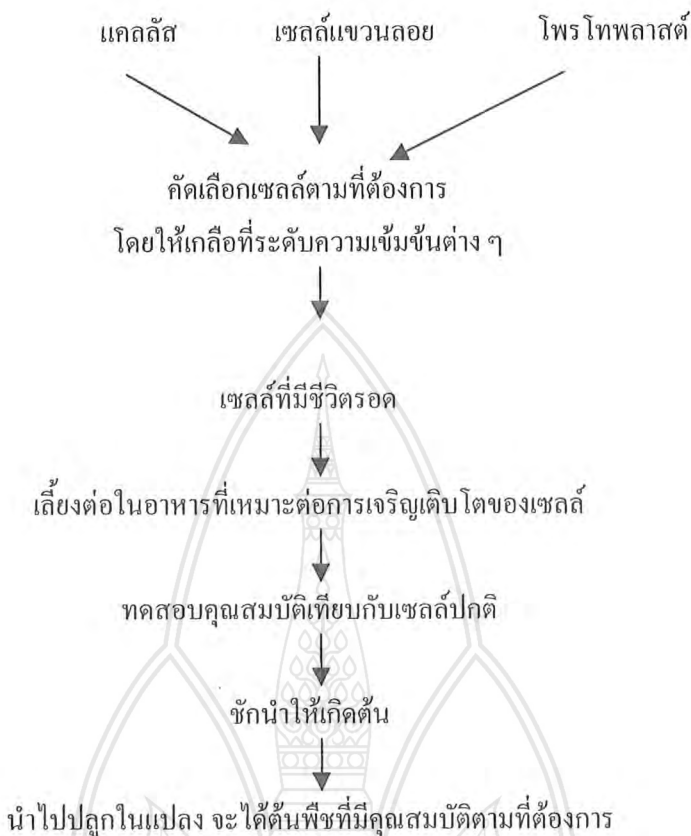
พื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากความเค็มของดินทั่วโลกมีประมาณ 400 ล้านเฮกตาร์ (hectares) ตัวอย่างพืชที่มีปัญหาดังกล่าว ได้แก่ ข้าว ทำให้มีการวิจัยที่หน่วยงานระหว่างชาติ เช่น International Rice Research Institute (IRRI) เพื่อทำให้ข้าวสามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ สภาพดินเค็มยังยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเกลือไปลดค่าออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) ของสารละลายในดินทำให้เซลล์รากพืชสูญเสียน้ำ และเมื่อมีไอออนของโซเดียม (Na^+) และคลอไรด์ (Cl^-) มากเกินไปจะเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเพราะไอออนไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ภายในพืช นอกจากนี้โซเดียมไอออนในดินที่มีความเข้มข้นสูงยังสามารถไปยับยั้งการดูดโพแทสเซียมไอออน (K^+) ในบาง

พื้นที่ของประเทศไทยมีเกลือในปริมาณสูง ซึ่งเป็นปัญหาสำหรับการทำการเกษตร เนื่องจากพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้มีความพยายามปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนทานต่อเกลือโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาไว้ในพืชต่าง ๆ (ตารางที่ 1) วิธีการสร้างพืชให้ทนทานต่อเกลือ ทำได้โดยใส่เกลือลงไปในการเพาะเลี้ยงแล้วคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ทนทานต่อเกลือได้ จากนั้นนำไปชักนำให้เกิดต้นพืชที่สมบูรณ์ แล้วทดสอบในสภาพแปลงต่อไป (รูปที่ 1) ก็จะทำได้ต้นพืชที่ทนต่อเกลือและสามารถนำไปปลูกในสภาพของดินที่มีความเค็มได้ ตัวอย่างของการคัดเลือกพืชทนเค็ม นูริมันอาห์วัง และคณะ (2539) ได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวมาใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยการคัดเลือกข้าวที่ทนเค็ม ข้าวเป็นอาหารหลักที่สำคัญของคนไทย โดยมีการผลิตได้ทั้งหมด 18.5 ล้านตันข้าวเปลือกภายในประเทศ 7.3 ล้านตันข้าวสาร และส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ 5 ล้านตันข้าวสาร ในพื้นที่ภาคใต้เกษตรกรมักประสบปัญหาดินเค็ม ได้มีการศึกษาวิจัยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเล็บนก PTNC 84210 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่นิยมของผู้บริโภคในประเทศไทย

ตารางที่ 1 การคัดเลือกพืชให้ทนทานต่อเกลือ

พืช	ปัจจัยการคัดเลือก	ผลการคัดเลือก
อัลมอนต์ (<i>Prunus amygdalus</i> Batsch.)	การขาดธาตุเหล็ก	ต้นพืชต้านทานต่อธาตุเหล็ก
ส้ม [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck]	โซเดียมคลอไรด์	พืชต้านทานเกลือ
แฟลกซ์ (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	โซเดียมซัลเฟต	พืชต้านทานเกลือ
องุ่น (<i>Vitis rupestris</i> Scheele)	โซเดียมคลอไรด์	กัพพะต้านทานเกลือ
มันฝรั่ง (<i>Solanum tuberosum</i>)	โซเดียมคลอไรด์, น้ำทะเล	แคลลัสต้านทานเกลือ
ข้าว (<i>Oryza sativa</i>)	โซเดียมคลอไรด์, น้ำทะเล	พืชต้านทานเกลือ
อ้อย (<i>Saccharum officinarum</i>)	โซเดียมคลอไรด์	แคลลัสต้านทานเกลือ
ยาสูบ (<i>Nicotiana tabacum</i>)	โซเดียมคลอไรด์	พืชทนเกลือ

ที่มา : Trigliano และ Gray (2000)



รูปที่ 1 แนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แถบดินภาคใต้ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการคัดเลือกข้าวทนเค็มในสภาพปลอดทดลองก่อนนำไปปลูกในแปลงต่อไป

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกข้าวทนเค็ม

1. อาหารชักนำให้คัพพะ (embryo) สร้าง แคลลัส ประกอบด้วยอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. อาหารคัดเลือกแคลลัสที่ทนเค็ม ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. อาหารเพื่อชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้น พืชที่สมบูรณ์ คือ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

วิธีการ นำเมล็ดข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานี PTNC 84210 มาแกะเปลือกออกแล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดข้าวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ต่อวัน ภายใน 4 สัปดาห์จะเกิดแคลลัส ลักษณะเซลล์เกาะกันแน่น จากนั้นย้ายลงอาหารเดิมเพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสให้ได้มากเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงย้ายลงใน

อาหารคัดเลือกที่มีเกลืออยู่โดยแคลสสได้รับความเข้มข้นของเกลือในปริมาณ 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าแคลสสในอาหารที่เติมเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิต 24.07 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าแคลสสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือ 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิต 8.30, 1.65 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำแคลสสไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ นำข้าวทงเค็มไปทดสอบในแปลงทดลอง ขนาดใหญ่ต่อไป

แนวทางการคัดเลือกพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช

ก่อนที่จะกล่าวถึงการคัดเลือกพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช ควรรู้จักความหมายของศัพท์บางคำที่ยังมีความเข้าใจที่สับสน คือ คำว่าต้านทานและทนทาน จากการให้คำจำกัดความของ WSSA (Weed Science Society of America) เมื่อปี ค.ศ. 1998 พบว่าการทนทานและต้านทานมีความหมายแตกต่างกัน การต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชเป็นลักษณะทางพันธุกรรม เมื่อพืชได้รับสารกำจัดวัชพืชแล้วสามารถที่จะต้านทานและมีชีวิตรอดได้ เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ การต้านทานเกิดขึ้นได้จากการคัดเลือกด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือพันธุวิศวกรรม ในขณะที่การทนทานสารกำจัดวัชพืชเป็นลักษณะจำเพาะของพืชแต่ละชนิดที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชแล้วสามารถที่จะทนทานได้ การทนทานจะเกิดขึ้นได้เอง ไม่ได้เกิดจากการคัดเลือก

การคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช

1. การคัดเลือกจากเซลล์แขวนลอย การคัดเลือกทำได้โดยนำแคลสสมาเลี้ยงในอาหารเหลวจนได้เซลล์แขวนลอยที่มีการกระจายเซลล์อย่างสม่ำเสมอ จากนั้นใส่สารกำจัดวัชพืชเพื่อให้เซลล์ได้รับสาร เซลล์ที่ได้อาจมีทั้งเซลล์ที่ต้านทานและไม่ต้านทานปะปนกัน การคัดเลือกเซลล์แขวนลอยอาจทำได้โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีสารกำจัดวัชพืช โคลนิจของเซลล์ที่

เกิดขึ้นจะเป็นโคลนิจของเซลล์ต้านทาน เทคนิคที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยบนอาหารแข็งทำได้ 2 วิธี

วิธีที่ 1 Spread-plate method โดยการปิเปตเซลล์แขวนลอย 1-2 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง ใช้แท่งแก้วเกลี่ยกระจายเซลล์ให้ทั่วบนผิวหน้าของอาหารแข็ง จากนั้นปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

วิธีที่ 2 Pour-plate method ทำได้โดยเตรียมอาหารและสารกำจัดวัชพืชให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า หลังจากนั้นทำการฆ่าเชื้อในอาหารด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ และฆ่าเชื้อในสารกำจัดวัชพืชด้วยการกรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย จากนั้นผสมอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชแล้วกับเซลล์แขวนลอยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารผสมกับเซลล์ได้ทั่วถึง พิ้งไว้จนอาหารแข็ง ปิดจานเพาะเชื้อด้วยแผ่นพาราฟิล์มแล้วนำไปบ่มในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

2. การคัดเลือกจากแคลสส การคัดเลือกเซลล์ต้านทานจากแคลสสทำได้โดยเลี้ยงแคลสสบนอาหารแข็งที่มีสารกำจัดวัชพืช เซลล์ที่ต้านทานจะมีการเติบโตอย่างรวดเร็วกว่าเซลล์ที่ไม่ต้านทาน

3. การคัดเลือกจากโพรโทพลาสต์ โดยการทำให้เซลล์พืชอยู่ในสภาพที่ปราศจากผนังเซลล์เหลือเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อให้โพรโทพลาสต์ได้รับสารกำจัดวัชพืชแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานโดยวิธี spread-plate หรือ pour-plate

การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาชักนำและคัดเลือกให้ได้เซลล์ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชมีประโยชน์อย่างมาก ทำให้ศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืชในระดับเซลล์ หรือในระดับต้นได้ ทำให้พัฒนาพืชสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช นอกจากนี้ยังศึกษาถึงกลไกการต้านทานของพืชได้ง่าย เนื่องจากเซลล์ในสภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีกิจกรรมของเซลล์เหมือนกับเซลล์ในต้นพืช จึงนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืชที่มีต่อกระบวนการทางชีวเคมีในระดับเซลล์ได้ ตัวอย่างการวิจัยที่ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกเซลล์

ด้านทานสารกำจัดวัชพืช มีรายงานการศึกษาในพืชหลายชนิดด้วยกัน เช่น รายงานของ Suwanwong et al. (1990) สามารถคัดเลือกเซลล์ของแครอทให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนต (glufosinate) ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชที่สามารถไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทส (glutamine synthetase) ที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นกลูตามีน สารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนตจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ทำให้การสะสมแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์พืช ทำให้พืชตาย วิธีการคัดเลือกโดยเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแครอทให้ได้รับสารกลูโฟซิเนตที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ แล้วคัดเลือกเซลล์ที่สามารถเติบโตได้เช่นเดียวกันกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืช Taregyan et al. (2001) ได้ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกเซลล์ของถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช imazethapyr และในปีเดียวกัน Warabi et al. (2001) รายงานการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen สำเร็จ เซลล์สามารถต้านทานต่อสารนี้ได้ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ ต่อมา Prasertsongsun et al. (2002) ได้ทำการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของแฟกที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนตได้สำเร็จ โดยการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และโพรลีน 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อให้สารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าเซลล์สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีกลูโฟซิเนตความเข้มข้น 5×10^{-5} โมลาร์

สรุป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่นำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ ถ้าจะให้ประสบความสำเร็จและนำไปใช้ได้อย่างแท้จริง ต้องสามารถชักนำเซลล์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ หรือใช้ในการศึกษาอิทธิพลของสารต่างๆ ที่มีต่อพืช แล้วคัดเลือกลักษณะพืชที่ทนทาน/ต้านทานต่อสารนั้น ๆ ได้ เช่น ทนเค็ม ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้ยังไม่สามารถใช้ได้กับ

พืชทุกชนิด แต่ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปศึกษาและพัฒนา เพื่อใช้ในสภาพจริงในแปลงปลูกต่อไป เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ต้องอาศัยเครื่องมือและอุปกรณ์มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพันธุวิศวกรรมที่นำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

บรรณานุกรม

- นุริมัน อหวัง, มินา นุกักดี และศิริวารี นันทพัฒน์ พิทยา. (2539). ผลของเกลือต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าว. รายงานปัญหาพิเศษทางชีววิทยา ปริญญาตรี. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.
- สมพร ประเสริฐสงสกุล. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาวิทยาศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.
- สมพล อุซชิน และระเร็น บุญดวง. (2537). ข้าวเจ้า เลี้ยงนกกปัตตานี. เอกสารสถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร. (แผ่นพับ)
- Prasertsongsun, S., Sangduen, N., Suwanwong, S., Santisopasri, V. and Matsumoto, H. (2002). Increased activity and reduced sensitivity of glutamine synthetase in glufosinate-resistant vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash) cells. *Weed Biology and Management*. 2:171-176.
- Suwanwong, S., Usui, K. and Ishizuka, K. (1990). Glufosinate tolerance in carrot cell suspension culture. *Weed Res. Japan*. 35:53-60.
- Taregyan, M.R., Mortimer, A.M. and Putwain, P.D. (2001). Selection for resistance to herbicide imazethapyr in somaclones of soyabean. *Weed Res.* 41:143-154.

Trigiano, R.N. and Gray, D.J. (2000). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. New York: CRC Press.

Warabi, E., Usui, K. and Matsumoto, H. (2001). Mechanism of resistance to oxyfluorfen in selected soybean cell line. In: Proc. 18th Asian-Pacific Weed Sci. Soc. Conf. May 28-June 2, 2001. Beijing, China. p.453-457.



Preservation Theorems Concerning g -Hausdorff and rg -Hausdorff Spaces

Chawalit Boonpok¹

Abstract

In this research, the concepts of topological spaces called g -Hausdorff and rg -Hausdorff spaces are introduced and the preservation theorems concerning g -Hausdorff and rg -Hausdorff spaces are investigated.

Introduction

Generalized closed (g -closed) sets in a topological space were introduced by Levine (1970) in order to extend many of the important properties of closed sets to a larger family. Palaniappan and Rao (1993) defined and investigated the notion of regular generalized closed (rg -closed) sets as a generalization of g -closed sets.

Balachandran et al. (1991) introduced the notion of generalized continuous (g -continuous) functions and gc -irresolute functions by using g -closed sets and obtained some of their properties. Palaniappan and Rao (1993) introduced the notion of regular generalized continuous (rg -continuous) functions and rg -irresolute functions.

The purposes of this paper are to introduce new concepts of Hausdorff spaces called g -Hausdorff and rg -Hausdorff spaces and to investigate preservation theorems concerning g -Hausdorff and rg -Hausdorff spaces.

Preliminaries

The symbols X , Y and Z denote topological spaces with no separation axioms assumed unless explicitly. The closure and interior of a subset A of a space X are denoted by $\bar{A}$ and $Int(A)$, respectively. If necessary, a subscript will be used to denote the space in which the operator is used.

Definition 1. A subset A of a topological space X is said to be regular open if $A = Int(\bar{A})$.

Definition 2. A topological space X is a T_2 -space (Hausdorff) if whenever x and y are distinct points of X , there are disjoint open sets U and V with $x \in U$ and $y \in V$.

Definition 3. A subset A of a space X is said to be g -closed (resp. rg -closed) provided that $\bar{A} \subseteq U$ whenever $A \subseteq U$ and U is open (resp. regular open) in X . A subset A is said to be g -open (resp. rg -open) if its complement is g -closed (resp. rg -closed).

Definition 4. A function $f: X \rightarrow Y$ is said to be g -continuous (resp. rg -continuous) provided that for every closed subset F of Y , $f^{-1}(F)$ is g -closed (resp. rg -closed).

¹Department of Mathematics, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150

Theorem 1. (Balachandran et al., 1991) *Let X and Y be topological spaces and $f : X \rightarrow Y$ is g-continuous if and only if the inverse image of every open in Y is g-open in X .*

Theorem 2. (Balachandran et al., 1991) *Let X and Y be topological spaces and $f : X \rightarrow Y$ is rg-continuous if and only if the inverse image of every open in Y is rg-open in X .*

Definition 5. A function $f : X \rightarrow Y$ is said to be gc-irresolute (resp. rg-irresolute) provided that for every g-closed (resp. rg-closed) subset F of Y , $f^{-1}(F)$ is g-closed (resp. rg-closed).

Theorem 3. (Palaniappan and Rao, 1993) *Let X and Y be topological spaces and $f : X \rightarrow Y$ is gc-irresolute if and only if the inverse image of every g-open in Y is g-open in X .*

Theorem 4. (Palaniappan and Rao, 1993) *Let X and Y be topological spaces and $f : X \rightarrow Y$ is rg-irresolute if and only if the inverse image of every rg-open in Y is rg-open in X .*

Preservation theorems concerning g-Hausdorff and rg-Hausdorff spaces

In this section, we define new concepts of Hausdorff spaces called g-Hausdorff and rg-Hausdorff spaces and investigate preservation theorems concerning g-Hausdorff and rg-Hausdorff spaces.

Definition 6. A topological space X is said to be g-Hausdorff if whenever x and y are distinct points of X , there are disjoint g-open sets U and V with $x \in U$ and $y \in V$.

It is obvious that every Hausdorff space is g-Hausdorff space. The following example shows that the converse is not true.

Example 1. Let $X = \{a, b, c\}$ and $\mathcal{G} = \{\emptyset, \{a\}, X\}$. It is clear that X is not Hausdorff. Since $\{a\}$, $\{b\}$ and $\{c\}$ are all g-open, it follows that X is g-Hausdorff.

Theorem 5. *Let X be a topological space and Y be Hausdorff. If $f : X \rightarrow Y$ is injective and g-continuous, then X is g-Hausdorff.*

Proof. Let x and y be any two distinct points of X . Then $f(x)$ and $f(y)$ are distinct points of Y because f is injective. Since Y is Hausdorff, there are disjoint open sets U, V in Y containing $f(x)$ and $f(y)$ respectively. Since f is g-continuous and $U \cap V = \emptyset$, we have $f^{-1}(U)$ and $f^{-1}(V)$ are disjoint g-open sets in X such that $x \in f^{-1}(U)$ and $y \in f^{-1}(V)$. Hence X is a g-Hausdorff.

Theorem 6. *Let X be a topological space and Y be g-Hausdorff. If $f : X \rightarrow Y$ is injective and gc-irresolute, then X is g-Hausdorff.*

Proof. Let x and y be any two distinct points of X . Then $f(x)$ and $f(y)$ are distinct points of Y because f is injective. Since Y is g-Hausdorff, there are disjoint g-open sets U, V in Y containing $f(x)$ and $f(y)$ respectively. Since f is gc-irresolute and $U \cap V = \emptyset$, we have $f^{-1}(U)$ and $f^{-1}(V)$ are disjoint g-open sets in X such that $x \in f^{-1}(U)$ and $y \in f^{-1}(V)$. Hence X is a g-Hausdorff.

Definition 7. A topological space X is said to be rg-Hausdorff if whenever x and y are distinct points of X , there are disjoint rg-open sets U and V with $x \in U$ and $y \in V$.

It is obvious that every g-Hausdorff space is rg-Hausdorff space. The following example shows that the converse is not true.

Example 2. Let $X = \{a, b, c\}$ and $\mathcal{S} = \{\emptyset, \{a\}, \{a, b\}, X\}$. Since $\{a\}$, $\{b\}$ and $\{c\}$ are all rg-open sets, it implies that X is rg-Hausdorff. Since $\{c\}$ and $\{b, c\}$ are not g-open in X , it follows that a and c cannot be separated by any two g-open sets in X . Hence X is not g-Hausdorff.

Theorem 7. Let X be a topological space and Y be Hausdorff. If $f : X \rightarrow Y$ is injective and rg-continuous, then X is rg-Hausdorff.

Proof. Let x and y be any two distinct points of X . Then $f(x)$ and $f(y)$ are distinct points of Y because f is injective. Since Y is Hausdorff, there are disjoint open sets U, V in Y containing $f(x)$ and $f(y)$ respectively. Since f is rg-continuous and $U \cap V = \emptyset$, we have $f^{-1}(U)$ and $f^{-1}(V)$ are disjoint rg-open sets in X such that $x \in f^{-1}(U)$ and $y \in f^{-1}(V)$. Hence X is a rg-Hausdorff.

Theorem 8. Let X be a topological space and Y be rg-Hausdorff. If $f : X \rightarrow Y$ is injective and rg-irresolute, then X is rg-Hausdorff.

Proof. Let x and y be any two distinct points of X . Then $f(x)$ and $f(y)$ are distinct points of Y because f is injective. Since Y is rg-Hausdorff, there are disjoint rg-open sets U, V in Y containing $f(x)$ and $f(y)$ respectively. Since f is rg-irresolute and $U \cap V = \emptyset$, we have $f^{-1}(U)$ and $f^{-1}(V)$ are disjoint rg-open sets in X such that $x \in f^{-1}(U)$ and $y \in f^{-1}(V)$. Hence X is a rg-Hausdorff.

References

- Balachandran, K. Sundaram, P. and Maki, H. (1991). On generalized continuous maps in topological spaces. Mem. Fac. Kochi Univ. 12:5-13.
- Levin, N. (1970). Generalized closed sets in topology. Rend. Circ. Mat. Palermo. 19:89-96.
- Palaniappan, N. and Rao, K.C. (1993). Regular generalized closed sets. Kyungpook Math. J. 33:211-219.



Performance Analysis of Edge Detection Methods for Macroscopic Images

Hanan H. A. Adlan¹, Abd Rahman Ramli¹, Shattri Mansor² and Bachok Taib³

Abstract

This paper investigates the effect of different methods on the edge detection applied to macroscopic images. Edge detectors affect further processing, and perform the basis for successful recognition of objects and classification problems. For this reason, a performance evaluation for the basic methods that work on local changes and variations of the intensity are explored on a SPOT1b satellite image. The methods investigated are Sobel, Prewitt, and Roberts. Another class represents Laplacian of Gaussian, and Canny methods. Among the methods investigated, the Canny produces a good representative edge map for the satellite image.

Introduction

Edge detection is a problem of fundamental importance in image analysis and computer vision. Edges occur at various resolutions, or scales, and represent transitions of different degrees or gradient levels. Fine edges comprise macroscopic images which make image processing more sensitive to the edge detector. Edges reflect the basic characteristic of images. Within an image, edges correspond to intensity discontinuities that result from different surface reflectance of objects, various illumination, or varying distance and orientation. In typical images, edges characterize object boundaries and are therefore useful for segmentation, registration, and identification of objects in a scene.

On the heart of segmentation is the selection of a suitable edge detection method for a particular application. Edges can be detected as rapid change in the gradient value within small area.

Algorithms in this area are based on either discontinuity or similarity. The former relies on partitioning the image based on abrupt changes, and deals with detection of isolated points, lines, and edges in an image. While the later accounts for thresholding, region growing, and region splitting and merging (Gonzalez and Woods, 1993). The zero crossing was first used by Haralik (Haralik, 1984). He used a threshold technique based on the image noise. Others suggest different approaches to thresholding (Voorhees and Poggio, 1987).

¹ Dept. of Computer and Communication Systems,

² Dept. of Civil Engineering, Faculty of Engineering, University Putra Malaysia. 43400, UPM, Serdang Selangor, Malaysia

³ Dept. of Mathematics, Faculty of Science, University Pendidikan Sultan Idris

This study investigates and evaluates different edge detection methods on satellite imagery as a representative for macroscopic images. The construction, characteristics, and performance of a number of gradient and zero-crossing operators are presented.

Theoretical aspects

Sharpening an image results in the detection of fine details as well as enhancing blurred ones. The magnitude of the gradient is the most powerful technique that forms the basis for various approaches to sharpening. The gradient vector points in the direction of maximum rate of change. For a function $f(x, y)$, the magnitude of the gradient of f at coordinates (x, y) is defined as

$$|\nabla f(x, y)| = \sqrt{(\partial_x f(x, y))^2 + (\partial_y f(x, y))^2} \quad (1)$$

while the gradient orientation is given by

$$\angle \nabla f(x, y) = \text{ArcTan}(\partial_y f(x, y) / \partial_x f(x, y)) \quad (2)$$

An alternative approach uses the zero-crossing operator which acts by locating zeros of the second derivatives of $f(x, y)$. The differential operator is used in the so-called zero-crossing edge detectors.

$$\nabla^2 f = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} \quad (3)$$

Thresholding allocates a range of pixel values to each object of interest. It works best with grayscale images that utilize the whole range of the grayscale. For the image $f(x, y)$, the thresholded image $g(x, y)$ is defined as

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{if } f(x, y) > T \\ 0 & \text{if } f(x, y) \leq T \end{cases} \quad (4)$$

where T is the threshold value.

Convolution operates on images of different sizes but of the same dimensionality. For an image of M rows and N columns, and a kernel of m rows and n columns, the convolved image will have $M - m + 1$ rows, and $N - n + 1$ columns, and the image is given by

$$O(i, j) = \sum_{k=1}^m \sum_{l=1}^n I(i+k-1, j+l-1) K(k, l) \quad (5)$$

where i runs from 1 to $M - m + 1$ and j runs from 1 to $N - n + 1$. The methodology implements many different operators, particularly spatial filters and feature detectors.

Sobel

Sobel filter is a simple approximation to the concept of gradient with smoothing. The 3x3 convolution mask is usually used to detect gradients in X and Y directions.

Prewitt

The Prewitt filter is very similar to Sobel filter. The 3x3 total convolution mask is used to detect gradient in the X, Y directions. Prewitt filter is a fast method for edge detection. The difference with respect to Sobel filter is the spectral response. It is only suitable for well-contrasted noiseless images.

Roberts

The Roberts Cross operator performs a simple, quick to compute, 2-D spatial gradient

measurement on an image. It thus highlights regions of high spatial frequency which often correspond to edges. In its most common usage, the input to the operator is a grayscale image, as is the output. Pixel values at each point in the output represent the estimated absolute magnitude of the spatial gradient of the input image at that point (Huertas and Medioni, 1986). It uses 22 convolution masks.

Laplacian of Gaussian

Laplacian of a Gaussian function is referred to as LoG. The filtering process can be seen as the application of a smoothing filter, followed by a derivative operation. The smoothing is performed by a convolution with a Gaussian function. Usually a truncated Gaussian function is used when the convolution is calculated directly. The derivatives applied to a smoothed function can be obtained by applying a convolution with the derivative of the convolution mask. One of the interesting characteristics of Gaussian is its circular symmetry which is coherent with the implicit anisotropy of physical data (Selvarajan and Tat, 2001).

Canny

Canny operator is the result of solving an optimization problem with constraints. The criteria are sensibility, localization and local unicity. The method can be seen as a smoothing filtering performed with a linear combination of exponential functions, followed by derivative operations.

Experiments

The image used in the experiments is a subsample of 512X512 pixels of surface from an original scene of about 2997X4139 pixels. Edges are detected using the Sobel, Prewitt, and Roberts methods, by thresholding the gradient function. For the Laplacian of Gaussian method, thresholding is computed for the slope of the zero crossings after filtering the image with the LoG filter. For the Canny method, thresholds is applied to the gradient using the derivative of a Gaussian filter. Figure 1 displays the 512X512 RGB subsample of the spot1b satellite image of the area of Sepang, Kajang and Bangi (Malaysia).

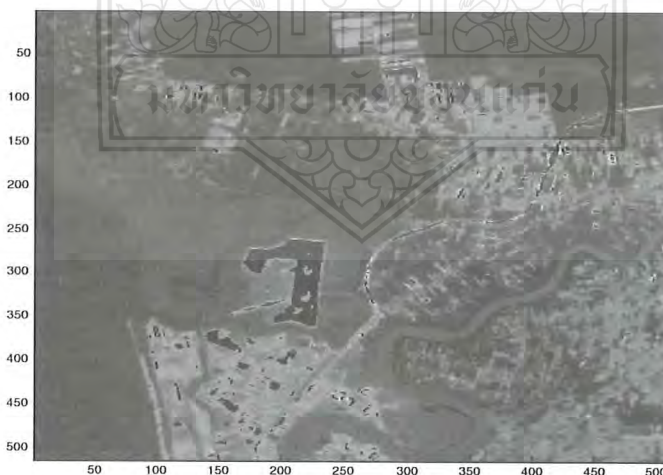


Figure 1 Portion of spot1b 2997 X 4139 scene over the area of Sepang, Kajang, Bangi (Malaysia). The image is 512 X 512 pixels.

Detection using Sobel filter

As mentioned before, the Sobel method finds edges using the Sobel approximation to the derivative. It returns edges at those points where the gradient of the image is maximum. Figure 2 displays the results of applying the Sobel method to the image of Figure 1.



Figure 2 Sobel edge map of Figure 1

Detection using Roberts

The Roberts method finds edges using the Roberts approximation to the derivative. It returns edges at those points where the gradient of the image is maximum. Figure 4 displays the results of applying the Roberts method to the image of Figure 1.

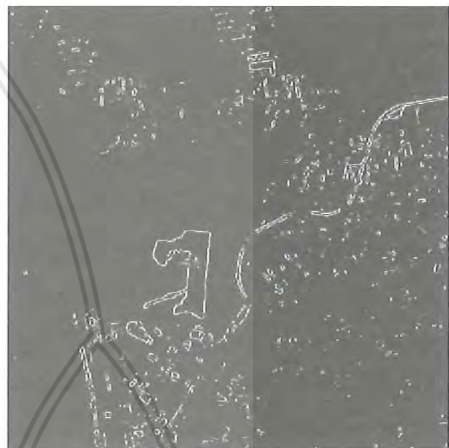


Figure 4 Roberts edge map of Figure 1

Detection using Prewitt filter

The Prewitt method finds edges using the Prewitt approximation to the derivative. It returns edges at those points where the gradient of the image is maximum. Results of applying this filter to Figure 1 is displayed in Figure 3.



Figure 3 Prewitt edge map of Figure 1

Detection using Canny

The Canny method finds edges by looking for local maxima of the gradient of the image. The gradient is calculated using the derivative of the Gaussian filter. The method uses two thresholds to detect strong and weak edges, and includes the weak edges in the output only if they are connected to strong edges. This method is therefore less likely than the others to be “fooled” by noise, and more likely to detect true weak edges. Figure 5 illustrates these points which are the result of applying this method to the satellite image of Figure 1.



Figure 5 Canny edge map of Figure 1

Detection using Laplacian of Gaussian

The Laplacian of Gaussian method finds edges by looking for zero crossings after filtering the image with the Laplacian of Gaussian filter. The edge map is shown in Figure 6.



Figure 6 Laplacian of Gaussian edge map of Figure 1

Performance evaluation

Edge detection methods investigated so far are further assessed by quality measures that give reliable statistical evidence to distinguish among the edge maps obtained. The absence of the ground truth edge map reveals the search for an alternative approach to assess and compare the quality of the edge maps resulted from the detectors exploited so far. The evidence for the best detector type is judged by studying the edge maps relative to each other through statistical evaluation. Upon this evaluation, an edge detection method can be employed to characterize edges to represent the image for further analysis and implementation. Table 1 gives the relative frequencies of the occurrence of edge pixels in the previous filters. For each edge map, $\max(n_{df})$ where n_{df} is the frequency of occurrence for the filter f is reported, and the ratio with respect to each other gives comparative statistics for the occurrence of edges. The Canny filter reports the higher detected edge pixels. A further analysis on the mean difference gives an evidence at the 95% confidence limit. The analysis is shown in Table 2.

Table 1 Relative frequencies (R) of the detected edge pixels

Operators	Canny	Lap. of Gaussian	Prewit	Sobel	Roberts
Canny	1	0.62386301	0.26857084	0.27046582	0.23339305
Lap. of Gaussian	1.602916	1	0.43049649	0.43353399	0.37410946
Prewit	3.72341244	2.32289929	1	1.00705581	0.8690186
Sobel	3.69732484	2.3066242	0.99299363	1	0.86292994
Roberts	4.28461766	2.67301447	1.15072335	1.15884263	1

Table 2 Significant edge differences at 0.05 level

	Can/Lap	Can/Pre	Can/Sob	Can/Rob	Lap/Pre	Lap/Sob	Lap/Rob	Pre/Sob	Pre/Rob	Sob/Rob
H	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
P	0	0	0	0	0	0	0	0.8404	1.2382e-004	5.0089e-005
CI	(0.0373, 0.0640)	(0.0772, 0.0847)	(0.0770, 0.0845)	(0.0811, 0.0886)	(0.0363, 0.0423)	(0.0361, 0.0421)	(0.0403, 0.0462)	(-0.0023, 0.0018)	(0.0019, 0.0059)	(0.0021, 0.0061)
STATS	18.7479	42.1842	42.1085	44.6352	25.7156	25.6107	28.6903	-0.2014	3.8533	4.0726

Table 2 summarizes the t-test for every pair combination of the detected edge maps. On comparing the average of the pair wise edge maps, the following statistics gives evidence on the judge for the best method in such environment. The only nonsignificant difference exists between the Prewit and the Sobel at 0.05 level of significance, with P-value given in the second row of the table. The STATS gives the t-statistics for every pair. The CI gives the confidence limit. In conclusion, Table 2 gives the evidence that the methods produce different edge maps, only for the Prewit and Sobel as mentioned previously.

Discussion

Figures 2 through 6 give edges maps for the different operators highlighted above. The focus in this study is on the detection of edges that produces a map representing the original image. This provides a foundation for selecting an appropriate edge detector for further application. Investigation is aimed at aiding the choice of an appropriate operator that is capable of detecting boundaries based on intensity discontinuities. From the results above, although the Sobel operator provides both differencing and smoothing, it detects part of the edges in the satellite image. The problem with the Roberts detector is that it relies on finding high spatial frequencies which fails to detect fine edges. This is illustrated in Figure 4.

The Laplacian responds to transitions in intensity. As a second order derivative, the Laplacian is sensitive to noise. Moreover, the Laplacian produces double edges and is sometimes unable to detect edge direction.

The Canny edge detector is capable of reducing noise. The Canny operator works in a multistage process. These can be summarized in a smoothing with a Gaussian filter, followed by gradient computation and use of a double threshold. The analysis in Table 2 illustrates the differences in the methods pair wise, only Prewit and Sobel have approximately the same edge map. The Canny produces the best edge map as evidenced by the relative frequency analysis in Table 1.

Conclusion

In this paper, we have analyzed the behavior of zero crossing operators and gradient operator on the capability of edge detection for satellite imagery as representative for macroscopic images. The methods are applied to the whole image. No specific texture or shape is specified. The objective is to investigate the effect of the various methods applied in finding a representation for the image under study. On visual perception, it can be shown clearly that the Sobel, Prewit, and Roberts low quality edge maps relative to the others are present in the image. A representation of the image can be obtained through the Canny and Laplacian of Gaussian methods. Among the various methods investigated, the Canny method is able to detect both strong and weak edges, and seems to be more suitable than the Laplacian of Gaussian.

A statistical analysis of the performance gives a robust conclusion for this complicated class of images. Remote sensing imagery contains both fine and sharp edges which make the work in this environment more sensitive and complicated.

References

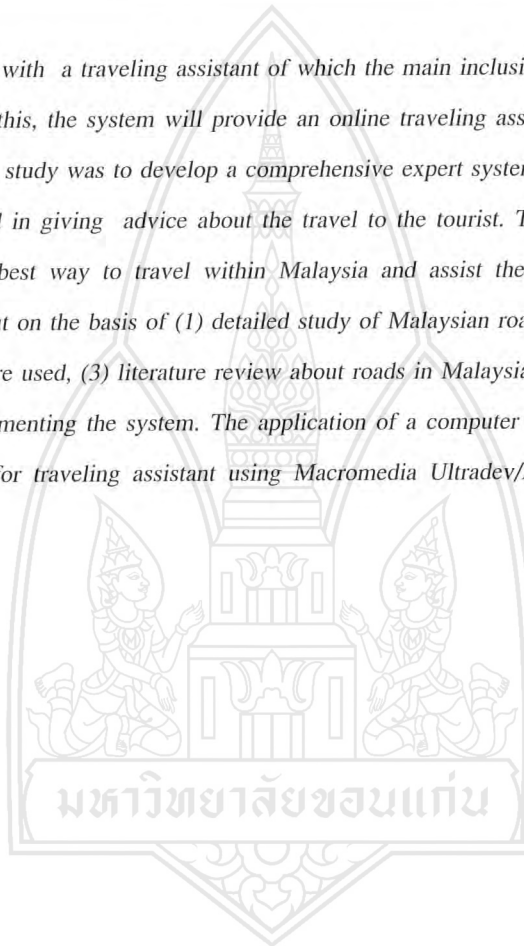
- Gonzalez, R. G. and Woods, R. E. (1993). Digital Image Processing. New York: Addison Wesley.
- Haralik, M. R. (1984). Digital step edges from zero crossings of the second directional derivatives. IEEE PAMI 6(1):58-68.
- Huertas, A. and Medioni, G. (1986). Detection of intensity changes with sub-pixel accuracy using Laplacian-Gaussian masks. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence. PAMI-8(5):651-664.
- Selvarajan, S. and Tat, W. C. (2001). Extraction of man-made features from remote sensing imageries by data fusion techniques. 22nd Asian Conference on Remote Sensing, 5-9 Nov. 2001, Singapore.
- Voorhees, H. and Poggio, T. (1987). Detecting textures and texture boundaries in natural images. ICCV 87:250-258.



An Expert System for Traveling Assistant (Malaysia Ecotourism)

***Asmawati Bt Ayob¹, Badrah Bt Yussof¹, Mohamed Daud¹,
Mohd. Zohadie Bardaie¹ and Abdul Rashid Mohamed Shariff³***

This research dealt with a traveling assistant of which the main inclusion would be the ecotourism sites offered to tourists. By this, the system will provide an online traveling assistant according to a tourist demand. The purpose of this study was to develop a comprehensive expert system (ES) in traveling assistant that could be used as an aid in giving advice about the travel to the tourist. This system will also advise them which would be the best way to travel within Malaysia and assist them in planning such travel. The research was carried out on the basis of (1) detailed study of Malaysian roads and ecotourism sites, (2) detailed study on the software used, (3) literature review about roads in Malaysia and expert system, and (4) designing, testing and implementing the system. The application of a computer technology used was in the form of an expert system for traveling assistant using Macromedia Ultradev/MX helps in analysis and development.



¹ Expert System Research Group, Department of Biological and Agricultural Engineering, Faculty of Engineering, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor D.E. Malaysia

Introduction

In recent years, special interest in tourism of various types has become increasingly popular (Weiler and Hall, 1992). As tourism becomes the largest industry in the world, its impact on the global economy is widely recognized (Goh and Law, 2003). Malaysia's latest campaign is entitled Malaysia Truly Asia and showcases the country's multicultural heritage and natural attraction as well as more contemporary attributes of sporting events and a modern capacity city (Henderson, 2003).

There has been a tremendous increase in the number of people traveling among various countries of the world for professional, social, recreational and humanitarian purposes, and this trend looks set to continue (Gezairy, 2003). Traveling in Malaysia is an exciting moment that one can never easily forget. The roads connected from one destination to the other offer major views with full convenience to the tourist. The entire expressways are connected to most cities in each state. This facilitates traveling within the country. In fact,

the tourist can choose the best route (shorter and takes less time) to the destination provided that complete information about the roads and highways in this country is available.

In Malaysia, the road network forms the backbone for the country's economic activities where almost 95% of transported goods and passengers use the network. Acknowledging the importance of road infrastructure, the government has allocated a sizeable proportion of the total allocation for infrastructure development for road development program (Othman and Sufian, 2001).

Problem statement

Data were collected from 100 tourists selected at random. They were from European countries and the United States of America. The questionnaires were distributed within a radius of 1 kilometer from the Kuala Lumpur City Center (KLCC) area. The sample study was carried out in the second week (one-week period) of March 2002, a good time period for tourists in Malaysia.

Table 1 Percentage of respondents who agreed or did not agree to the given statements (n = 100)

Statement	Yes		No	
	Percentage	Frequency	Percentage	Frequency
1. Are you informed or advised which route to take before arrival in Malaysia?	15	15	85	85
2. Do you have fast information pertaining to associated places of interest/route to take?	25	25	75	75

The survey carried out is shown in Table

1. Therefore, the problem statements would be as follows:

1. Future tourists are not informed and advised which route to take before arrival in Malaysia.

2. Variability or new development of places of interest associated with the route to be taken by visitors cannot be informed fast enough to future tourists and interested parties.

Objectives of the study

The general objective was to develop a simple and user-friendly online expert system travel assistant for tourists.

However, the specific objectives of this study included the following.

1. To develop an expert system that easily assists a tourist in selecting the most appropriate route to follow and to gain information about tourism in Malaysia.

2. To provide a database that stores relationship; it allows an administrator to make assertions, denials, and conditional test; and this may be active or inactive.

3. To provide a high security (password) while accessing the administrative site.

Scope of the study

The scope of this study is to make a system as useful as possible in assisting the tourist with their traveling in Malaysia. The system gives advice about the road they should get through, interesting ecotourism places along the road they can visit, and the accessories they should bring with.

This is a flexible system which can be updated on the databases from time to time. To get good assistance from the system, the tourist must correctly answer the entire given questions. Otherwise, the output advice will go away or become useless.

Traveling Assistant Expert System

Several decades ago, many expert system applications were developed and reported in the literature (Wagner et al., 2003). Muthuswamy and Srinivasan (2003) implemented an online expert

system called *iProphet*, and successfully tested on two laboratory-scale process development case studies—bacterial (*Escherichia coli*) fermentation and laboratory-scale yeast (*Pichia pastoris*) fermentation. This online expert system was successfully implemented in Hong Kong's travel and tourism industry, where the development of e-commerce is a golden opportunity for the country's travel agencies to advance their technology in the ever-changing business environment.

According to Timothy and Tosun (2003), international boundaries can create real and perceived barriers to travel. Even friendly borders can be a hindrance for some people when cultural and economic differences exist on opposite sides, when safety concerns are present, as well as when crossing formalities are required. One must not be segregated from enjoying the nature. Ecotourism focuses on the natural beauty, geology, flora and fauna of a particular area along with its indigenous cultures (Masberg and Morales, 1999).

Malaysia's earnings from tourism increased by threefold in 2002 despite global economic uncertainties and security threats. Tourist arrivals last year touched 13.13 million, believed to be the highest ever recorded, bringing in RM 26.41 billion in foreign exchange. Adding to this is some 7.80 million excursionists, day-trippers and transit passengers, who brought in RM 1.23 billion (Ganesan, 2002).

This expert system was developed according to the needs in maximizing the visitor's tourism fulfillment. The online system can be accessed from all over the world and will tremendously help the tourist in choosing the best route they can take. The advice given was

accorded from the data during the “question and answer” session. This system will list down the best route to their destinations, total distance and also the most interesting places they can visit along the route. Similarly, the system will help tourist in choosing the most appropriate route even before they touch down in Malaysia.

Bases of suggestions/advice include time or season of visit, duration of travel (days/weeks), entry point (e.g. airport, seaport), location (e.g. town, district), places of interest or ecotourism site or sites (along the route) and accessories.

Materials and Methods

Development tools are defined as hardware and software used during the system development life cycle. Software development tools are easy to use and allow room for programmers and non-technical users to create programs for whatever jobs that must be accomplished. Some examples of software development tools are Dreamweaver MX, ASP, VBScript and Microsoft Access (database).

Macromedia Dreamweaver MX is an integrated family of tool, server, and client technologies for building Rich Internet Applications that can be delivered across major platforms and devices. With the tools provided, the information such as text can directly be entered onto the page and some of the information can be inserted automatically with built-in objects and behaviors.

ASP is a server side-scripting environment (meaning that the bulk of the work processing script is done by the server rather than by the browser) that allows you to embed Javascript or VBScript code into your HTML documents. That code can then be processed by the server to accomplish a wide variety of tasks. ASP pages can communicate with databases, customize each visitor's website experience through the use of cookies, and even password-protect the entire site so that each visitor has to log on and be properly authenticated before gaining access (Nicholson, 2002).

VBScript offers a relatively easy scripting language to learn and use. In fact anyone with familiarity of Microsoft's Visual Basic language will feel quite comfortable jumping in with VBScript (Nicholson, 2002).

System implementation

System implementation can be glanced through the diagram below. Figure 1 is the context diagram of Traveling Advisor Expert System.

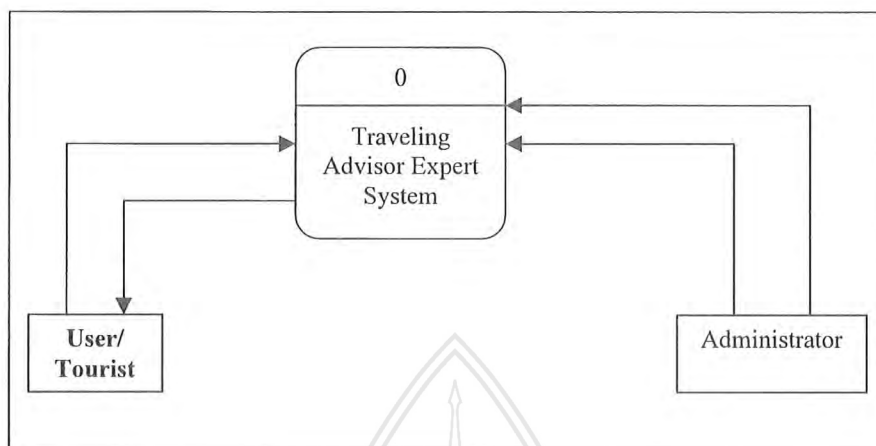


Figure 1 Context diagram

System design is based on these four sections:

1. Administrative
2. Destination
3. Info Malaysia
4. Advisor

Figure 2 shows the overall flow chart of the section in this expert system.

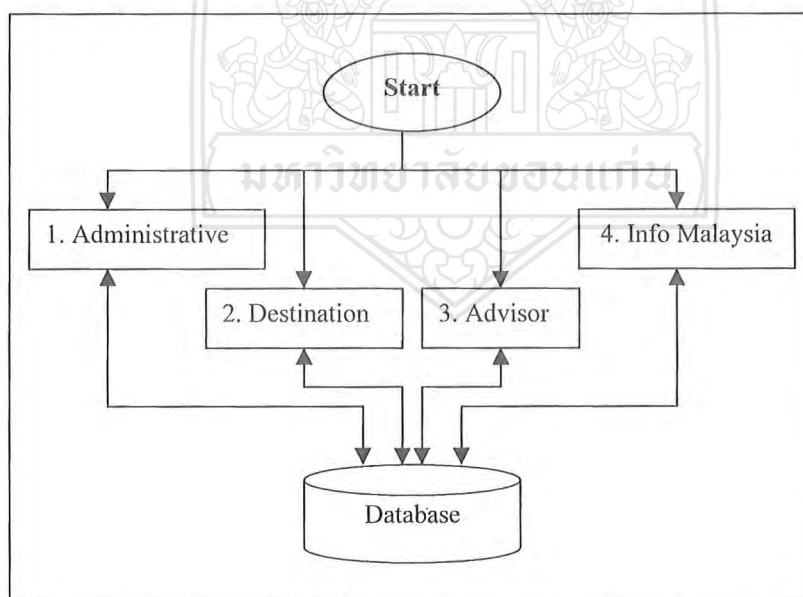


Figure 2 Overall flow chart of Lets Travel

The operation of this system includes the performance of a number of tasks related to finding the eligible and recommended traveling advice for the tourist. The consultation starts with the main menu of the website. The tourist then must select the Advisor menu to get the advice. After the selection, the tourist will be asked a few questions related to their journey. After giving the needed answers, the system will display the result. The information given will be processed using the data in the database before generating the appropriate advice. The system will then advise them the route to take according to their preference followed by the advice about other places of interest along the route and accessories they can bring with.

Results and Discussion

Administrative section

The administration site is a completely separate website from the other sites. The access to the administration site will be restricted using different criteria from the main site. In addition, those who are accessing it may need to see additional information on accessing functions such as adding, editing, and deleting records that a traditional visitor doesn't need to have access to. The system will verify the username and password combination match data located in the database. Figure 3 is the flow chart for the Administrative section.

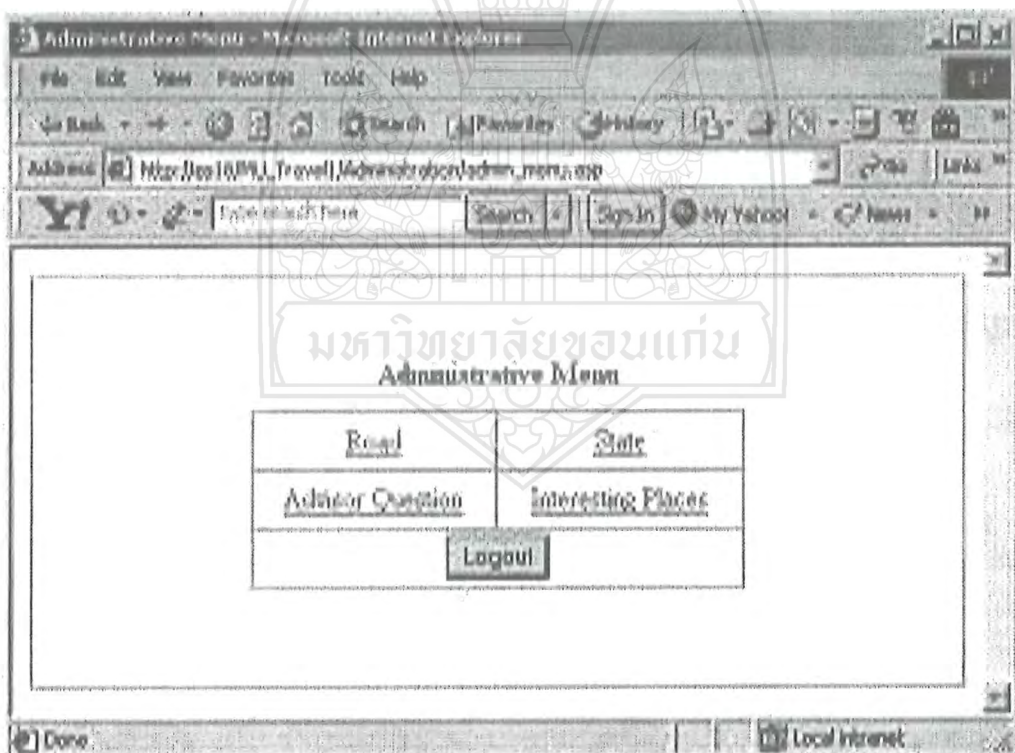


Figure 3 Administrative menu

Destination section

This site will provide only information about the distance and the route to be passed from one destination to another destination according to the tourist needs. A user can directly choose the

destination without sorting the list of destination either by alphabetical order or by exit order. Selection must be made to get the result for the distance and route. The result comes from the database.

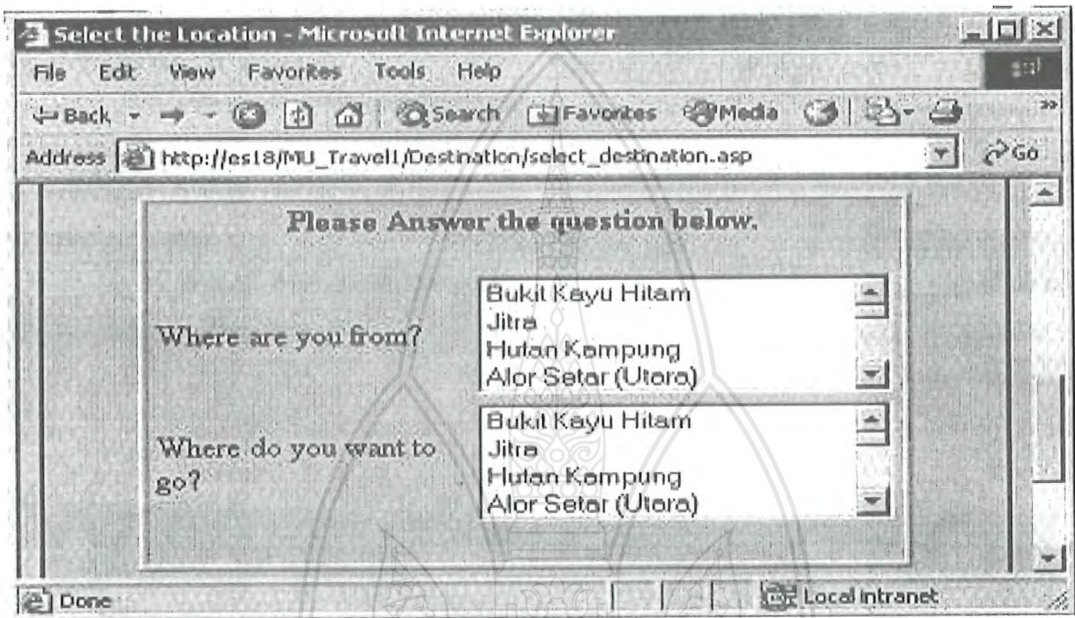


Figure 4 The question asked to get the distance between destination

Info Malaysia section

By entering this section, a user will go to the page where it shows the map of Malaysia. The user can get the information of certain states or highways by selecting the state or the highway given. Then the system will provide the information about the state, highway, places of interest for each state and the places of interest along the highway. All the information about the state and the highway is stored in the database.

Figure 5 shows the map of Malaysia.

By clicking on the state or the highway, the user will bring himself to the information site. The pictures of interesting places in each state are also provided.



Figure 5 The state information site

Advisor section

This is the most important section in this system. The main objective of developing this expert system is to help and advise the tourist about traveling in Malaysia. So this is the section where the tourist will get help and advice about their needs.

The tourist will be asked a few questions before being provided with the advice. Figure 6 shows an example of the advice given to the tourist after submission of their answers.

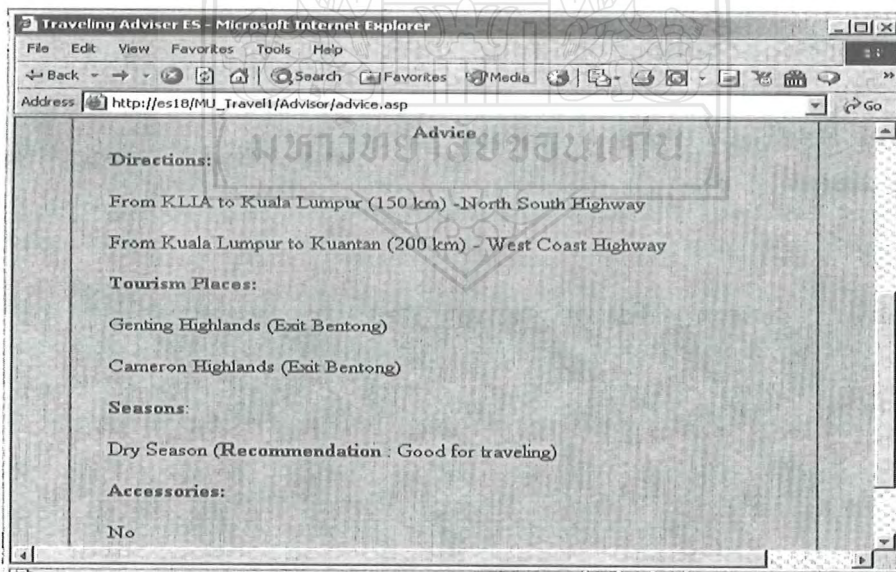


Figure 6 The advice given

Conclusion

This travel assistant has been constructed to give advice to the tourist about the suitable time for traveling in Malaysia, route to take, places of interest and accessories they have to bring with. This system is online so that one can get the information and the advice before leaving for Malaysia. This online system assistant uses ASP as an Internet programming and Microsoft Access for the system database. The system was tested using the dummy data. The results were validated by comparison with the real data.

References

- Ganesan, V. (2003). Higher tourism earnings last year. *News Straits Times*, 18 January 2003, p.16.
- Gezairy, H.A. (2003). Travel epidemiology: WHO perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21(2):86-88.
- Goh, C. and Law, R. (2003). Incorporating the rough sets theory into travel demand analysis. *Tourism Management*. (in press)
- Henderson, J.C. (2003). Managing tourism and Islam in Peninsular Malaysia. *Tourism Management*. (in press)
- Masberg, B.A. and Morales, N. (1999). A case analysis of strategies in ecotourism development. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 2(3):289-300.
- Muthuswamy, K. and Srinivasan, R. (2003). Phase-based supervisory control for fermentation process development. *Journal of Process Control*. 13(5):367-382.
- Nicholson, S. (2002). *Inside Dreamweaver Ultradev 4*. Indianapolis: New Riders Publishing.
- Othman, M.R. and Sufian, Z. Hj. (2001). Road management and maintenance - challenges and future directions. *Buletin Ingenieur*. 13:19-23.
- Timothy, D.J. and Tosun, C. (2003). Tourist's perceptions of the Canada-USA border as a barrier to tourism at the International Peace Garden. *Tourism Management*. (in press)
- Wagner, W.P., Chung, Q.B. and Najdawi, M.K. (2003). The impacts of problem domains and knowledge acquisition techniques: a content analysis of P/OM expert system case studies. *Expert Systems with Applications*. 24(1):79-86.
- Weiler, B. and Hall, C. (eds.). (1992). *Special Interest Tourism*. London: Bellhaven Press.



ผลของกรดแทนนิกที่ระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อเหงือก ลำไส้ ตับ และไต ของปลานิล

ประสาทพร บริสุทธิ์เพชร¹, ชุตินา หาญจวนิช², อำพา เหลืองภิรมย์³ และองอาจ เลหาวิจิ³

บทคัดย่อ

ผลของกรดแทนนิกที่ระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.) ขนาดความยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร และน้ำหนัก 0.3-0.4 กรัม ตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 97.5 มิลลิกรัม/ลิตร ผลต่อการเปลี่ยนแปลงจุลพยาธิสภาพของเหงือก พบว่า เซลล์บุผิวที่ gill filament เพิ่มจำนวน gill lamellae เชื่อมติดกันและเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เซลล์บุผิวของ gill lamellae แยกตัวออก และมีการคั่งของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ gill lamellae แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจุลพยาธิสภาพของลำไส้ ตับ และไต

Abstract

Acute effect of tannic acid (97.5 mg/l, 96 hours) on *Oreochromis niloticus* (L.) with body length of 2.5-3.5 cm and weight of 0.3-0.4 g were studied. The histopathological changes of gills in some test fish were investigated. Hyperplasia of epithelial cells of gill filaments, fusion, disarray, aneurysm of gill lamellae and lifting of epithelium of gill lamellae were observed. In contrast, there were no histopathological changes in intestine, liver and kidney.

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

¹ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

² ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

ปัจจุบันมีบ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม และพื้นที่การเกษตรตั้งอยู่ใกล้กับแหล่งน้ำธรรมชาติ มีการนำน้ำมาใช้ประโยชน์ด้านอุปโภค บริโภค ล้าง และทำความสะอาดวัตถุและเครื่องจักร หล่อลื่น และระบายความร้อนจากเครื่องจักร และนำน้ำมาใช้ทางเกษตรกรรม (Wilber, 1969) น้ำทิ้งที่ปล่อยจาก บ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม และการเกษตรลงสู่สภาพแวดล้อมมีผลทำให้เกิดมลภาวะต่อระบบนิเวศทางน้ำ ปลาซึ่งอยู่ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนมักได้รับผลกระทบอย่างรุนแรง โดยเฉพาะถ้าสิ่งปนเปื้อนไม่สลายตัว หรือสลายตัวได้น้อย จะมีผลอย่างสูงต่อชีววิทยาของสัตว์น้ำ สารปนเปื้อนเหล่านี้อาจมีฤทธิ์เสริมกัน ในกรณีที่มิใช่สารปนเปื้อนหลายชนิดอยู่ด้วยกัน ผลพิษทางน้ำสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในระดับชีวเคมีของเซลล์ มีผลต่อประชากรสัตว์น้ำทั้งหมด (Bernet et al., 1999) ในประเทศแถบสแกนดิเนเวียมีการศึกษากันอย่างมากเกี่ยวกับผลกระทบของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมทำเชื้อและกระดาษต่อปลา แต่เป็นการยากที่จะเปรียบเทียบผลการศึกษา เพราะน้ำทิ้งมีคุณภาพและปริมาณของสารปนเปื้อนต่างกัน แม้ว่าน้ำทิ้งจะถูกปล่อยออกจากแหล่งอุตสาหกรรมเดียวกันก็ตามแต่ปล่อยที่เวลาต่างกัน (Andersson et al., 1987) มีรายงานว่าน้ำทิ้งจากการทำอุตสาหกรรมป่าไม้เป็นพิษอย่างรุนแรงต่อลำธารที่รับน้ำเนื่องจากมีปริมาณแทนนินสูง และความเป็นพิษของแทนนินสามารถลดลงได้โดยถูกย่อยด้วยรา *Aspergillus niger* (Field and Littinga, 1990) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของสารแทนนินในรูปกรดแทนนิกที่ระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อจุลพาริสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก ลำไส้ ตับ และไตของปลานิล *Oreochromis niloticus* (L.)

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. สารเคมี

สารแทนนินในรูปกรดแทนนิก (ผลิตโดยบริษัท Riedel-de Haen ประเทศสหพันธรัฐเยอรมัน)

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

2. สัตว์ทดลองและการเลี้ยง

นำลูกปลานิลขนาดลำตัว 2.5-3.5 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.3-0.4 กรัม จากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น กรมประมง มาเลี้ยงด้วยน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน สถานที่ทดลอง คือ เรือนสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งมีแสงแดดและอากาศถ่ายเทดี และได้ทำการพักปลาไว้ก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม ให้อาหารปลาอัดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 1 ครั้ง แต่งดให้อาหารปลา ก่อนการทดลอง 24 ชั่วโมง และระหว่างการทดลอง

3. วิธีการทดลอง

3.1 ทดสอบความเป็นพิษของกรดแทนนิกที่ทำให้ลูกปลานิลตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง)

ใช้กรดแทนนิกความเข้มข้น 0.02, 0.2, 2.0, 20.0 และ 200.0 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในแต่ละความเข้มข้นใช้ลูกปลานิล 8 ตัวทดสอบ และทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยทดลองในขวดโหลแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร สูง 28 เซนติเมตร มีปริมาตรน้ำ 4 ลิตร เมื่อได้ค่าความเข้มข้นช่วงกว้างของกรดแทนนิกที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง นำลูกปลานิลชุดใหม่มาทดสอบด้วยกรดแทนนิกเข้มข้น 50, 75, 100, 125, 150 และ 175 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยใช้ลูกปลานิลจำนวน 10 ตัวทดสอบ ในแต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 2 ซ้ำ ผลที่ได้จากการทดลองนี้นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดแทนนิกที่ทำให้ลูกปลานิลตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งได้ความเข้มข้น 97.5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้วิธีวิเคราะห์ในน้ำนิ่ง (static bioassay) ตามวิธีของ Sprague (1969) และใช้โปรแกรม probit analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Finney, 1971)

3.2 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและเคมีบางประการของน้ำที่มีกรดแทนนิก

น้ำที่ใช้ทดสอบในการทดลอง 3.1 ทำการวัด (1) อุณหภูมิและอากาศ (องศาเซลเซียส, °ซ.) โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ชนิดปรอทวัด (2) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) (มิลลิกรัม/ลิตร) โดยใช้เครื่อง DO meter รุ่น YSI 51 B Yellow Spring Instrument Co. Ohio 45387, USA และ (3) พีเอชของน้ำ โดยใช้ pH meter รุ่น HM-14P TOA Electronics Ltd., Japan ที่ช่วงเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกสองทาง (Two-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 9.0 for Windows (Norusis, 1993)

3.3 ศึกษาพฤติกรรมของปลาใน

สังเกตพฤติกรรมการว่ายน้ำและการหายใจของปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับกรดแทนนิกในระดับที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง ทุกวันเป็นเวลา 4 วัน

3.4 ศึกษาผลของกรดแทนนิกต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลพาริสภาพของเนื้อเยื่อ เหงือก ลำไส้ ตับ และไตของลูกปลานิล

การทดลองแบ่งออก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเลี้ยงลูกปลาในน้ำประปาที่ไม่มีกรดแทนนิก และกลุ่มทดลองเลี้ยงลูกปลาในน้ำที่มีกรดแทนนิกเข้มข้น 97.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทดลองกลุ่มละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว ให้อาหารปลาตลอดการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างปลาทั้ง 2 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปรักษาสภาพตัวอย่างปลาทันทีในน้ำยา 10% buffer neutral formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการศึกษาสภาพเนื้อเยื่อต่อไป

3.5 เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาลักษณะจุลพาริสภาพ

นำตัวอย่างปลาที่ได้จากการทดลอง 3.4 มาตัดส่วนเหงือก ลำไส้ ตับ และไต ขนาด 0.5 เซนติเมตร และนำไปทำสไลด์ถาวรด้วยกรรมวิธีพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อหนา 7 ไมโครเมตร และย้อมสี haematoxylin และ eosin (H&E) (Humason, 1979) ส่องดูเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ผลการทดลอง

1. ความเป็นพิษของกรดแทนนิก

พบว่ากรดแทนนิกที่ทำให้ลูกปลาตายร้อยละ 50 ในเวลา 96 ชั่วโมง คือ ความเข้มข้น 97.5 มิลลิกรัม/ลิตร

2. ปัจจัยทางกายภาพและเคมีบางประการของน้ำ

ผลของอุณหภูมิของน้ำและอากาศของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากัน คืออยู่ในช่วง 28.0-31.0 °ซ. และ 31.0-33.5 °ซ. ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายน้ำของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ปนเปื้อนกรดแทนนิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{(1, 40)} = 96.639$, $p < 0.001$) พบว่าค่าเฉลี่ยของออกซิเจนละลายน้ำของกลุ่มควบคุมที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมีค่าลดลงแต่ไม่มากเท่ากลุ่มทดลอง (ตารางที่ 1)

ค่าเฉลี่ยของพีเอชของน้ำกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{(1, 40)} = 206.259$, $p < 0.001$) และค่าเฉลี่ยของพีเอชของน้ำที่ช่วงเวลาต่างก็มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{(1, 40)} = 295.341$, $p < 0.001$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าออกซิเจนละลายน้ำ และพีเอชของน้ำที่เวลาต่าง ๆ

คุณสมบัติของน้ำ	กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของคุณภาพน้ำที่เวลาต่างๆ				
		0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ควบคุม	6.2 $\pm$ 0.04 ^a	3.5 $\pm$ 0.21 ^b	4.0 $\pm$ 0.00 ^c	3.9 $\pm$ 0.06 ^c	5.0 $\pm$ 0.00 ^d
	ทดลอง	6.2 $\pm$ 0.06 ^a	0.4 $\pm$ 0.00 ^b	1.0 $\pm$ 0.00 ^c	1.4 $\pm$ 0.03 ^c	1.4 $\pm$ 0.00 ^c
พีเอช	ควบคุม	7.0 $\pm$ 0.02 ^a	7.1 $\pm$ 0.00 ^b	7.2 $\pm$ 0.00 ^c	7.5 $\pm$ 0.00 ^d	7.6 $\pm$ 0.00 ^c
	ทดลอง	6.7 $\pm$ 0.01 ^a	6.8 $\pm$ 0.00 ^b	7.0 $\pm$ 0.00 ^c	7.3 $\pm$ 0.00 ^d	7.5 $\pm$ 0.00 ^c

หมายเหตุ ตัวเลขในแนวนอนเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยใช้ Two-way ANOVA

3. พฤติกรรมของลูกปลานิลที่ตอบสนองต่อกรดแทนนิก

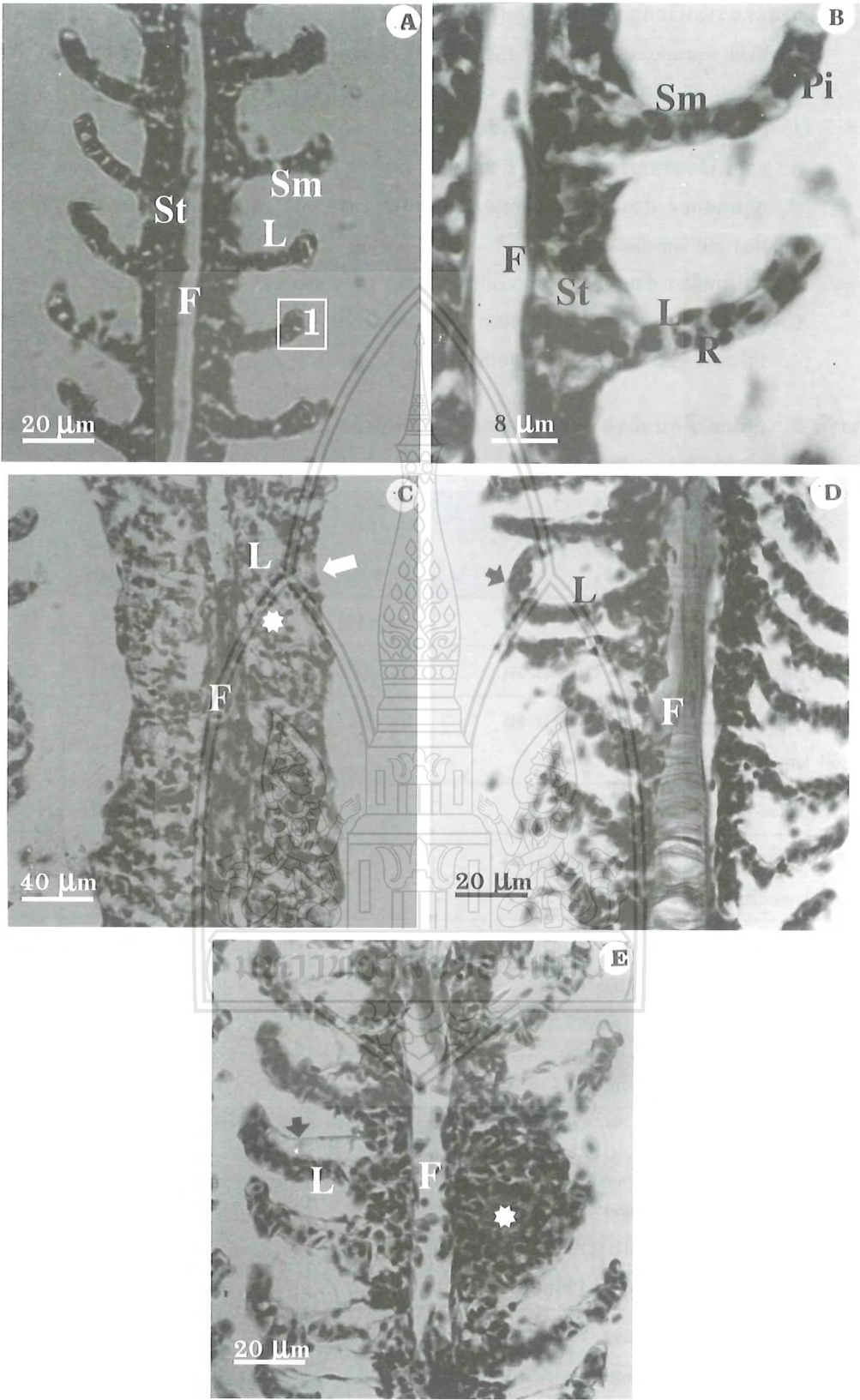
ลูกปลานิลที่เลี้ยงในสารละลายกรดแทนนิกในระดับที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 พบว่าลูกปลานิลมีพฤติกรรมว่ายน้ำผิดปกติไปจากปลากลุ่มควบคุม คือ มีการลอยตัวอยู่นิ่งที่บริเวณผิวน้ำ อ้าปากสูบอากาศที่ผิวน้ำ หายใจถี่ขึ้นโดยสังเกตจากการปิด-เปิดแผ่นปิดเหงือก

4. ผลของกรดแทนนิกต่อลักษณะจุลพยาธิวิทยาของเหงือกปลา ไล่ ตับ และไต

4.1 เหงือก

ปลากลุ่มควบคุมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ทุกตัว และปลากลุ่มทดลองร้อยละ 50 (4/8) ที่ 24 ชั่วโมง, ร้อยละ 12.5 (1/8) ที่ 48 ชั่วโมง, ร้อยละ 25 (2/8) ที่ 72 ชั่วโมง และร้อยละ 37.5 (3/8) ที่ 96 ชั่วโมง เหงือกมีลักษณะปกติ (รูปที่ 1 A, B) คือ gill filament ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ผิวหนังรูปแบบบางเรียงตัวซ้อนกัน 3-5 ชั้น (stratified squamous epithelium) มี gill lamellae แยกออกจาก gill

filament ทั้งสองข้าง และ gill lamellae ถูกหุ้มด้วยเซลล์เยื่อผิวหนังแบบบางชั้นเดียว (simple squamous epithelium) ภายใน gill lamellae ประกอบด้วย pillar cells เป็นเซลล์ค้ำจุน และมีเซลล์เม็ดเลือดแดงแทรกระหว่าง pillar cells ส่วนปลากลุ่มทดลองที่เหลือมีลักษณะจุลพยาธิสภาพของเหงือกผิดปกติดังนี้ (ตารางที่ 2) คือ เซลล์เยื่อผิวหนังของ gill filament บางบริเวณเพิ่มจำนวน (hyperplasia) ทำให้ gill lamellae บริเวณดังกล่าวเชื่อมติดกัน (fusion) (รูปที่ 1C) gill lamellae บางบริเวณจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (disarray) (รูปที่ 1D) พบมีการคั่งของเซลล์เม็ดเลือดแดง (aneurysm) ภายใน blood sinus ของ gill lamellae บางบริเวณ (รูปที่ 1E) และเซลล์ผิวหนังของ gill lamellae บางบริเวณแยกตัวออก (lifting) (รูปที่ 1E) นอกจากนี้ยังพบว่าเหงือกของปลาบางตัวมีลักษณะผิดปกติหลายอย่างร่วมกัน (รูปที่ 1E)



รูปที่ 1 ภาพตัดขวางเหงือกปลานิล แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ : gill filament (F), gill lamella (L), stratified squamous epithelium (St), simple squamous epithelium (Sm), pillar cell (Pi) และ red blood cell (R) (H&E)

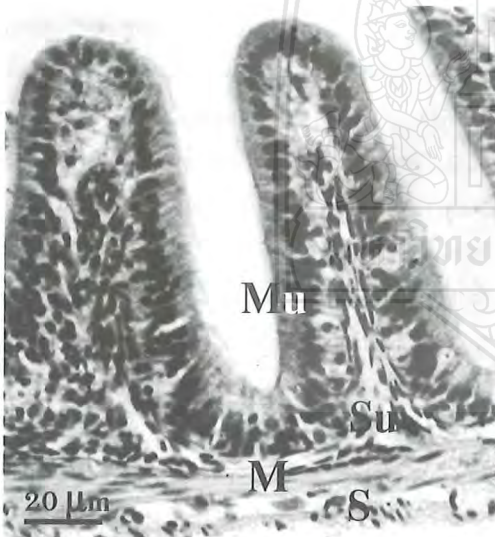
- A. กลุ่มควบคุม แสดงลักษณะปกติของเหงือก
- B. ภาพกำลังขยายสูงของบริเวณ 1 ของรูปที่ 1A
- C. กลุ่มทดลอง สังเกตการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อหุ้ม (*) ของ gill filament และการเชื่อมติดกัน ($\uparrow$) ของ gill lamellae
- D. กลุ่มทดลอง สังเกตการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ($\uparrow$) ของ gill lamellae
- E. กลุ่มทดลอง สังเกตการคั่งของเซลล์เม็ดเลือดแดงใน sinus (*) ของ gill lamellae และเซลล์เยื่อหุ้มของ gill lamellae แยกตัวออก ($\uparrow$)

ตารางที่ 2 ลักษณะผิดปกติของเหงือกปลาในกลุ่มทดลองที่ได้รับกรดแทนนิกที่ระดับความเป็นพิษเฉียบพลัน ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือก	จำนวนตัว/จำนวนตัวทั้งหมด (%) ที่เวลาต่างๆ			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
ปกติเหมือนกลุ่มควบคุม	4/8 (50)	1/8 (12.5)	2/8 (25)	3/8 (37.5)
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน	3/8 (37.5)	1/8 (12.5)	2/8 (25)	2/8 (25)
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน + gill lamellae เชื่อมติดกัน	1/8 (12.5)	-	-	-
gill lamellae เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ	-	1/8 (12.5)	1/8 (12.5)	-
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน + gill lamellae เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ	-	1/8 (12.5)	2/8 (25)	-
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน + เนื้อเยื่อหุ้มของ gill lamellae แยกตัว	-	1/8 (12.5)	-	1/8 (12.5)
เซลล์เม็ดเลือดแดงคั่งใน sinus	-	1/8 (12.5)	-	-
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน + gill lamellae เชื่อมติดกัน และเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ + เซลล์เม็ดเลือดแดงคั่งใน sinus	-	2/8 (25)	-	-
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน + gill lamellae เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ + เนื้อเยื่อหุ้มของ gill lamellae แยกตัว	-	-	-	1/8 (12.5)
เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament เพิ่มจำนวน + เซลล์เม็ดเลือดแดงคั่งใน sinus	-	-	1/8 (12.5)	1/8 (12.5)

4.2 ลำไส้

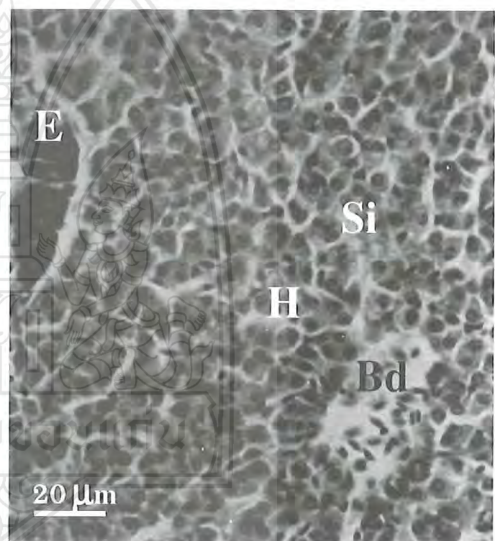
ลักษณะจุลพยาธิสภาพลำไส้ของปลากลุ่มควบคุมและปลากลุ่มทดลองที่เลี้ยงนาน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ พบมีลักษณะปกติ (รูปที่ 2) ประกอบด้วยชั้น mucosa เป็นชั้นในสุดของลำไส้ ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อผิวหนังรูปร่างทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว (simple columnar epithelium) มีนิวเคลียสอยู่ใกล้ฐานของเซลล์ มีเซลล์เมือก (mucous cell) แทรกระหว่างเซลล์เยื่อผิวหนัง ชั้นถัดมาเป็นชั้น submucosa ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งช่วยค้ำจุนชั้น mucosa และเป็นแกนกลางของวิลโล (villi) ที่ยื่นเข้าไปในช่องว่างของลำไส้ พบมีเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) แทรกอยู่ระหว่างชั้น mucosa และชั้น submucosa ชั้นถัดมาเป็นชั้นของ muscularis ซึ่งประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบเรียงตัว 2 ชั้น โดยชั้นในเรียงตัวตามแนวขวาง ส่วนชั้นนอกเรียงตัวตามแนวยาว ชั้นนอกสุดเป็นชั้นของ serosa ซึ่งเป็นชั้นของเนื้อเยื่อผิวหนังรูปแบบบางเรียงตัวชั้นเดียว



รูปที่ 2 ภาพตัดขวางลำไส้ของปลานิล แสดงชั้นต่าง ๆ : ชั้น mucosa (Mu), ชั้น submucosa (Su), ชั้น muscularis (M) และชั้น serosa (S) (H & E)

4.3 ตับ

เนื้อเยื่อตับของปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เลี้ยงนาน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีลักษณะปกติเหมือนกันทุกตัว (รูปที่ 3) คือ ประกอบด้วยเซลล์ตับ (hepatocyte) เป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยม ไซโทพลาซึมย้อมติดสีชมพูของ eosin มีนิวเคลียสรูปกลมย้อมติดสีม่วงของ haematoxylin อยู่กลางเซลล์ และพบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน เซลล์ตับของปลาบางตัวพบนิวเคลียสถูกไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรตเบียดไปชิดขอบของเซลล์ พบ central vein และ exocrine pancreas แทรกระหว่างเซลล์ตับ และพบ sinusoid แยกออกจาก central vein โดยแทรกกระจายในแนวรัศมีระหว่างเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังพบท่อน้ำดี (bile duct) แทรกอยู่ใกล้ ๆ กับท่อนเลือดในเนื้อเยื่อตับอีกด้วย

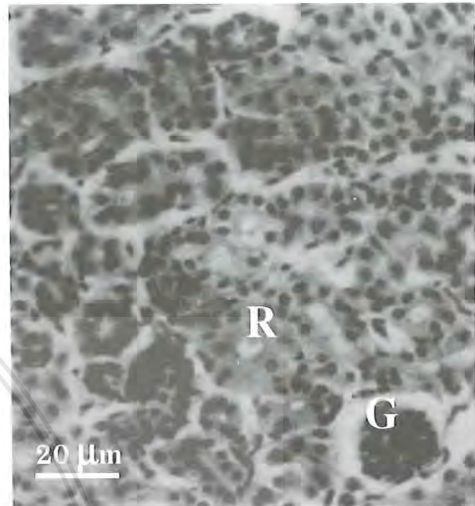


รูปที่ 3 ภาพตัดขวางตับของลูกปลานิลกลุ่มควบคุม แสดงลักษณะปกติ สังเกต hepatocyte (H), sinusoid (Si), exocrine pancreas (E) และ bile duct (Bd) (H&E)

4.4 ไต

ลักษณะจุลพยาธิสภาพไตของปลาทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เลี้ยงนาน 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่ามีลักษณะปกติ (รูปที่ 4) ประกอบด้วย

ด้วยหน่วยไต (nephron) และท่อไต (renal tubule) หน่วยไตประกอบด้วย renal corpuscle เป็นกลุ่มของเส้นเลือดฝอย เรียกว่า glomerulus อยู่ภายใน Bowman's capsule ซึ่งหุ้มด้วยผนัง 2 ชั้น ชั้นนอกเป็น parietal layer ประกอบด้วยเซลล์รูปแบนบางเรียงตัวชั้นเดียว ชั้นในคือ visceral layer อยู่ติดกับผนังด้านนอกของ glomerulus และมีช่องว่างแทรกกระหว่างผนังทั้ง 2 ชั้นนี้ เรียกว่า Bowman's space ติดต่อกับช่องว่างของท่อไต ท่อไตแบ่งออกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ neck segment ท่อไตส่วนต้น (proximal segment) และท่อไตส่วนท้าย (distal segment) โดย neck segment เป็นส่วนที่ติดต่อกับ Bowman's space ประกอบด้วยเซลล์เยื่อหุ้มรูปลูกบาศก์ (cuboidal epithelium) นิวเคลียสย้อมติดสีเบโซฟิลิก (basophilic) เข้มกว่า นิวเคลียสของเซลล์บุผิวท่อไตส่วนอื่น ท่อไตส่วนต้นประกอบด้วยเซลล์บุผิวรูปทรงกระบอกเรียงตัวชั้นเดียว (simple columnar epithelium) มีนิวเคลียสรูปรางกลมขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์หรือใกล้ฐานของเซลล์ และมีไมโครวิลไล (microvilli) เรียงเป็นแถว (brush border) อยู่ที่ผิวด้านบนของเซลล์ ท่อไตส่วนปลายประกอบด้วยเซลล์เยื่อหุ้มรูปทรงกระบอกเตี้ย (low columnar epithelium) มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์หรือค่อนข้างมาทางฐานเซลล์ ไม่มี brush border ช่องว่าง (lumen) ของท่อไตส่วนปลายมีขนาดเล็กกว่า ช่องว่างของท่อไตส่วนต้น นอกจากนี้ยังพบ Corpuscle of Stannius อยู่ที่ขอบด้านข้างของไตส่วนท้าย มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์รูปรางกลม ย้อมติดสีเบโซฟิลิก มีหลอดเลือดฝอยแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ดังกล่าว และโครงสร้างทั้งหมดถูกหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน



รูปที่ 4 ภาพตัดขวางไตของลูกปลานิลกลุ่มควบคุมแสดงลักษณะปกติ ประกอบด้วย glomerulus (G) และ renal tubule (R) (H&E)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของกรดแทนนิกที่ทำให้ลูกปลานิลตายร้อยละ 50 ที่เวลา 96 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 97.5 มิลลิกรัม/ลิตร และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเหงือก พบว่าเหงือกของปลากลุ่มทดลองบางตัวมีลักษณะผิดปกติ ได้แก่ เซลล์บุผิวของ gill lamellae เพิ่มจำนวน ทำให้ gill lamellae บริเวณดังกล่าวเชื่อมติดกัน gill lamellae เรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีทิศทางไม่แน่นอน มีการคั่งของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ gill lamellae และพบว่าเหงือกของปลาบางตัวมีลักษณะผิดปกติหลายลักษณะร่วมกัน ลักษณะผิดปกติของเหงือกที่พบอาจเป็นการตอบสนองต่อการอักเสบของปลากลุ่มทดลองต่อความเป็นพิษที่เกิดจากกรดแทนนิก ซึ่งสอดคล้องกับ Meyer and Hendricks (1985) ที่ได้รายงานว่าเหงือกปลามีการตอบสนองต่อการอักเสบที่เกิดจากสารพิษชนิดต่าง ๆ หรือเกิดจากการติดเชื้อโรคซึ่งทำให้สูญเสียพื้นที่ผิวในการหายใจและอาจทำให้ปลาตายเพราะขาดออกซิเจนก่อนที่สารพิษ หรือการติดเชื้อจะไปถึงผลต่อปลาโดยตรง เช่นเดียวกับ Mitz and Giesy (1985) ได้รายงานว่าการที่เนื้อเยื่อเหงือกมีพยาธิสภาพ

เปลี่ยนแปลงไป ทำให้การแพร่ของออกซิเจนผ่านเหงือกลดลง เป็นผลทำให้กิจกรรมต่าง ๆ ของปลาลดลงด้วย การทดลองครั้งนี้ได้สังเกตพฤติกรรมการว่ายน้ำของปลากลุ่มทดลอง พบว่าปลาที่มีกิจกรรมต่าง ๆ ลดลง โดยปลาส่วนใหญ่ลอยนิ่งที่ผิวน้ำ อ้าปากสูบอากาศและมีการหายใจถี่ขึ้น แสดงอาการของการขาดออกซิเจน เมื่อเปรียบเทียบกับพฤติกรรมของปลากลุ่มควบคุมที่ว่ายน้ำไป-มาอย่างว่องไว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ufodike and Omeregic (1994) ที่ได้รายงานว่าเป็นปลาไนล์ (*Oreochromis niloticus* L.) มีการหายใจถี่ขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดจากเปลือกคัน *Balanites aegyptiaca* และต้น *Kigelia africans* จากการศึกษาปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ พบว่ากรดแทนนิกมีผลทำให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำลดลงอย่างมาก และต่ำกว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำของกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และยังพบว่าน้ำของกลุ่มทดลองมีสีน้ำตาล ทั้งนี้อาจเนื่องจากออกซิเจนถูกนำไปใช้ออกซิไดส์กรดแทนนิกซึ่งเกิดขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำและมีความเป็นพิษเพิ่มมากกว่าเดิม (Robinson and Graessle, 1942) ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ากรดแทนนิกมีผลทำให้น้ำมีความเป็นกรดมากกว่าน้ำของกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gehrke et al. (1993) ที่ศึกษาผลของแทนนิน-ลิกนินสกัดจากซากใบยูคาลิปตัส *Eucalyptus camaldulensis* ต่อปลา golden perch (*Macquaria ambigua*) พบว่าทำให้น้ำมีความเป็นกรดมากขึ้น และค่าออกซิเจนละลายน้ำลดลง ซึ่งตามปกติค่าพีเอชของน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและการเจริญเติบโตของปลาน้ำจืด ควรอยู่ในช่วง 6.0-9.0 ค่าออกซิเจนละลายน้ำควรมีอย่างน้อย 5 มิลลิกรัม/ลิตร (Snieszko and Axelord, 1976)

มีกรณีศึกษาหลายรายงานที่สนับสนุนผลของสารพิษชนิดต่างๆ ต่อเหงือกปลา เช่น Gehrke et al. (1993) ทดลองเลี้ยงปลา golden perch (*Macquaria ambigua*) ในน้ำที่มีใบยูคาลิปตัส 20 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 30 นาที พบว่า gill lamellae เชื่อมติดกัน เซลล์เยื่อผิวเหงือกหลุดลอกและเซลล์เหงือกตาย มีรายงาน

ว่าในปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) และปลา brown trout (*Salmo trutta*) ซึ่งรับน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษและกิจกรรมที่ใช้พืชเป็นวัตถุดิบ พบ gill lamellae เชื่อมติดกัน เซลล์บุผิวของ gill lamellae เพิ่มจำนวนและขยายขนาด (Couillard et al., 1988; Bucher and Hofer, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากพืชที่มีผลต่อพยาธิสภาพของเหงือกปลานิล เช่น สารสกัดจากใบถอบแถบน้ำ *Derris frifoliata* (จิรารัช ศรีจันทร์งาม, 2540) และสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก *Brassaia actinophylla* (นันทนา ปิตทอง และคณะ, 2542)

การศึกษานี้ยังสามารถสรุปได้ว่ากรดแทนนิกที่ระดับความเป็นพิษเฉียบพลันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเหงือกเท่านั้น เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะแรกที่สัมผัสกับสารพิษที่ละลายในน้ำได้โดยตรง กรดแทนนิกยังทำให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำลดลง และเพิ่มความเป็นกรดของน้ำมากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมว่ายน้ำและการหายใจของปลานิล แต่กรดแทนนิกไม่มีผลต่อพยาธิสภาพของลำไส้ ตับ และไตของปลาตลอดช่วงเวลา 96 ชั่วโมงที่ทดลองไม่มีการให้อาหาร ดังนั้นกรดแทนนิกจึงเข้าไปไม่ถึงลำไส้ ตับ และไตของปลา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- จิรารัช ศรีจันทร์งาม. (2540). การศึกษาผลกระทบของสารสกัดใบถอบแถบน้ำ *Derris trifoliata* Lour ที่มีผลต่อเนื้อเยื่อปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn. ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นันทนา ปิตทอง, พินิจ หวังสมนึก และละออศรี เสนาะเมือง. (2542). ผลของสารสกัดจากใบหนวดปลาหมึก (*Brassaia actinophylla*

- Endl.) ในระดับความเป็นพิษเฉียบพลันต่อเนื้อเยื่อผิวหนัง ระบบทางเดินอาหาร ระบบขับถ่ายและระบบหายใจของปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 27(3):241-254.
- Andersson, T., Bengtsson, B., Forlin, L., Hardig, J. and Larsson, A. (1987). Long-term effects of bleached kraft mill effluents on carbohydrate metabolism and hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 13:53-60.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22:25-34.
- Bucher, F. and Hofer, R. (1993). The effects of treated domestic sewage on three organs (gill, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*). *Water Research*. 27(2):255-261.
- Couillard, C.M., Berman, R.A. and Panisset, J.G. (1988). Histopathology of rainbow trout exposed to a bleached kraft pulp mill effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 17:319-323.
- Field, J.A. and Littinga, G. (1990). Treatment and detoxification of aqueous spruce bark extracts by *Aspergillus niger*. *Water Science Technology*. 24(3-4):127-137.
- Finney, D.J. (1975). *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gehrke, P.C., Revell, M.B. and Philbey, A.W. (1993). Effects of river red gum, *Eucalyptus camaldulensis*, litter on golden perch *Macquaria ambigua*. *Journal of Fish Biology*. 43(2):265-279.
- Humason, G. L. (1979). *Animal Tissue Techniques*. 3rd ed. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Meyer, T.R. and Hendricks, J.D. (1985). Histopathology. In: Rand, G.M. and Petrocelli, S.R. (eds). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Washington, DC: Hemisphere Publishing. p.283-331.
- Mitz, S.V. and Giesy, J.P. (1985). Sewage effluent biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 10:22-39.
- Norusis, M.J. (1993). *SPSS for window base system user's guide release 6.0*. Chicago: SPSS. *Environmental Safety*. 24:63-71.
- Robinson, H.J. and Graessle, O.E. (1942). Toxicity of tannic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 77:63-69.
- Snieszko, S.F. and Axelord, A.R. (1976). *Diseases of Fishes*. Environmental Stress and Fish Diseases. New Jersey: T.F.H. Publications. p.89-107.
- Sprague, J.B. (1969). Measurement of pollutant toxicity to fish. *Bioassay methods for acute toxicity*. *Water Research*. 3:793-829.
- Ufodike, E.B.C. and Omeregbe, E. (1994). Acute toxicity of water extracts of barks of *Balanites aegyptica* and *Kigelia africana* to *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management*. 25(9):875-879.
- Wilber, G.C. (1969). *The Biological Aspects of Water Pollution*. Illinois: Charles C. Thomas Publisher.



การส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดย *Agrobacterium tumefaciens*

ทศพร พิพัฒน์ภานุกุล¹, สุนันทิพย์ บุณนาค¹, ปิยะดา ชีระกุลพิสุทธ¹ และมานิตย์ โหมยิตระกุล¹

บทคัดย่อ

ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีแสง พบว่าเมล็ดข้าวสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 18 ไมโครโมลาร์ ในการศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวให้เจริญเป็นต้นใหม่ พบว่าอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v), NAA 2.5 ไมโครโมลาร์ และ BA 13.5 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นต้น โดยทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้น 60% และมีจำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 6 ต้น ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) ที่มียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และสายพันธุ์ EHA105 (pCambia1301) ที่มียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสและต้นข้าวที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

Abstract

The highest percentage of callus induction was obtained when seeds of rice cv. Chainat1 were cultured on a modified N_6 medium supplemented with 18 μM 2,4-D under light condition. The suitable regeneration medium for this rice cultivar was N_6 medium supplemented with 3% (w/v) sucrose, 2.5 μM NAA and 13.5 μM BA. Callus culture on this medium resulted in a regeneration percentage of 60 and 6 shoots/callus. Transformations of rice cv. Chainat1 mediated by *A. tumefaciens* were performed. *A. tumefaciens* strain LBA4404 harbored plasmid pBI121 containing *nptII* gene and *gus* gene while strain EHA105 harbored plasmid pCambia1301 containing *hptII* gene and *gus* gene. Gus activities were found in rice calluses and the study of gene expression in transgenic rice in T_0 and T_1 generations showed the inheritance of transgenes.

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ Graminae ปลูกอยู่ในเขตต่างๆ ทั่วโลก เช่น เอเชีย ยุโรป อเมริกาใต้ และออสเตรเลีย ประชากรมากกว่าหนึ่งในสามของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก International Rice Research Institute (IRRI) รายงานว่ามีพื้นที่เพาะปลูกของข้าวประมาณ 11% ของพื้นที่เพาะปลูกทั่วโลก โดยเป็นพื้นที่ในทวีปเอเชียมากกว่า 90% ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกข้าวที่สำคัญประเทศหนึ่ง แต่ปัญหาจากโรคข้าวและแมลงศัตรูข้าวรวมถึงสภาพพื้นที่ปลูกที่ไม่เหมาะสม เช่น ดินเค็มและความแห้งแล้ง ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงในแต่ละปีประเทศไทยมีการนำเข้าสารเคมีเพื่อควบคุมความรุนแรงของโรคและแมลงศัตรูพืชปีละจำนวนมาก ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มภาระต้นทุนให้แก่เกษตรกรแล้วยังส่งผลเสียในระยะยาวต่อระบบนิเวศอีกด้วย

การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ทำให้พืชมีลักษณะพิเศษ เช่น ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังใช้ระยะเวลาในการศึกษาน้อยกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (conventional plant breeding) การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอะโกรแบคทีเรียเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง อะโกรแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยในดิน จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae ตามธรรมชาติแล้วแบคทีเรียชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค crown gall ในพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากอะโกรแบคทีเรียมีคุณสมบัติสามารถถ่ายถอดชิ้นส่วนยีนที่มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิโนและไซโทไคนินเข้าสู่เซลล์พืช และเข้าไปแทรกในจีโนมของพืชได้ทำให้เซลล์พืชบริเวณที่ติดเชื่อมีการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้ในปริมาณสูงมากและเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นก้อน

เนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นปุ่มปม จากความสามารถตามธรรมชาติของอะโกรแบคทีเรียที่สามารถถ่ายถอดข้อมูลทางพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์พืชได้ทำให้เกิดแนวคิดในการประยุกต์ใช้อะโกรแบคทีเรียเพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) โดยตัดยีนบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์ออกซิโนและไซโทไคนินออกไปแล้วนำเอายีนที่ต้องการมาแทรกเข้าไปแทนที่ เช่น ยีนที่มีสมบัติทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช ยีนที่มีสมบัติทนทานต่อแมลงศัตรูพืช ยีนทนเค็ม ฯลฯ อะโกรแบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นพาหะถ่ายถอดยีนดังกล่าวเข้าไปแทรกในโครโมโซมพืช Chan et al. (1993) รายงานการถ่ายถอดยีนที่มีสมบัติทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยอะโกรแบคทีเรีย A218 โดยใช้คัพภะอ่อนของข้าวเป็นเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายถอดยีนและสามารถสร้างข้าวจากไปนิกาแปลงพันธุ์ที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช G418 ได้ Park et al. (1996) ศึกษาการถ่ายถอดยีนที่มีสมบัติทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช phosphinotricin (PPT) เข้าสู่ปลายยอดอ่อนของข้าวจากไปนิกาพันธุ์ Maybelle โดยอะโกรแบคทีเรีย EHA101 และสามารถเพาะเลี้ยงปลายยอดให้เจริญเป็นต้นข้าวที่ทนทานต่อสาร PPT ได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความรู้เบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 ซึ่งยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการสร้างข้าวแปลงพันธุ์ดังกล่าว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 ให้เจริญเป็นแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 ที่แกะเปลือกแล้วมาล้างบริเวณผิวภายนอกด้วยผงซักฟอกและน้ำประปาให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวโดยแช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 1 นาที และสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 2% ที่เติม Tween-20 2-3 หยดต่อสารละลายคลอโรกซ์ 100 มิลลิลิตร

เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อวางบนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% และ 2, 4-D ความเข้มข้น 4.5, 9, 13.5 และ 18 ไมโครโมลาร์ (pH = 5.8) โดยวางให้คัพเพาะสัมผัสกับอาหาร นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 °ซ. บันทึกจำนวนเมล็ดที่สร้างแคลลัสและน้ำหนักรวมแคลลัส

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการสร้างต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1

นำแคลลัส อายุ 3 สัปดาห์ ขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ชักนำให้เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1 บนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลง ที่เติม 2, 4-D มาเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 % และเติม NAA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 4.5, 9, 13.5 และ 18 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 °ซ.

การศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดยอะโกรแบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ใช้อะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้แก่ LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCambia1301) โดยนำโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว Luria broth (LB) 20 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงสายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) ในอาหารที่เติมกานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และสเตรปโตมัยซินเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ลิตร และเลี้ยงสายพันธุ์ EHA105 (pCambia1301) ในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร และกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร นำขวดมาวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.0 นำเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมไว้ซึ่งได้แก่ แคลลัส และเมล็ดข้าวมาวางลงในจาน

เพาะเชื้อที่มีสารแขวนลอยแบคทีเรีย เขย่าจนเพาะเชื้อเบาๆ เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่เมล็ดและแคลลัสทิ้งไว้ 60 และ 30 นาทีตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง แช่เมล็ดและแคลลัสให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatmann No.1 ฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 3%, 2, 4-D ความเข้มข้น 18 ไมโครโมลาร์ (pH = 5.8) ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อพืช โดยนำไปแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 15 นาที แช่เมล็ดและแคลลัสให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatmann No. 1 ฆ่าเชื้อ แล้วย้ายเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนผ่านอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติมซีโฟแทกซิมเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนผ่านอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 (pCambia1301) นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับไฮโกรมัยซินเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตไปเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) NAA เข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์ (pH = 5.8) และเติมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับอาหารสูตรเดิม ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 °ซ.

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี *gus* assay

นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบ ซึ่งได้แก่ แคลลัส และใบข้าว มาแช่ด้วยกระดาษกรองให้แห้งใส่ในหลอด eppendorf แล้วเติม X-gluc assay buffer ให้ท่วมเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแช่ใบข้าวในเอทานอลเข้มข้น 95 %

จนกระทั่งใบและต้นไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ จึงตรวจสอบสีของเนื้อเยื่อ

การตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค

polymerase chain reaction (PCR)

นำใบข้าวจากต้นข้าวที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และต้นข้าวควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการตรวจสอบ โดยดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) ที่ใช้สำหรับการทำ PCR คือ CaMV35S (5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' และ 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3') และ สภาวะของการทำ PCR คือ denaturation 94 °ซ./3 นาที, amplification 94 °ซ./20 วินาที, 50 °ซ./40 วินาที, 72 °ซ./60 วินาที จำนวนรอบ 40 รอบ final extension 72 °ซ./3 นาที และ cooling phase 4 °ซ./1 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลการทำ PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

ผลการทดลอง

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นแคลลัส

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นต้น พบว่าอาหารสูตร N₆ ดัดแปลง ที่เติม 2, 4-D ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำเมล็ดให้สร้างแคลลัสได้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารเป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตพบยอดอ่อนสีเขียวและแคลลัสสีเหลืองขนาดเล็กเจริญจากบริเวณคัพภะ และต่อมาแคลลัสขยายขนาดขึ้น มีลักษณะเกาะตัวกัน (รูปที่ 1) เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีการสร้างแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 92% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 18 ไมโครโมลาร์

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการสร้างต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการสร้างต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์

ชัยนาท 1 พบว่าเมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเป็นระยะเวลา 10-15 วัน สังเกตพบจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนแคลลัสและเจริญเป็นต้นในเวลา 45 วัน โดยต้นใหม่ที่เกิดขึ้นไม่มีการเจริญของราก แคลลัสข้าวพันธุ์ ชัยนาท 1 สามารถเจริญเป็นต้นใหม่โดยมีเปอร์เซ็นต์สูงสุดบนอาหารที่เติม NAA เพิ่มขึ้น 2.5 ไมโครโมลาร์ และ BA เพิ่มขึ้น 13.5 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 แคลลัสที่ชักนำให้เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 บนอาหารที่เติม 2, 4-D



รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA

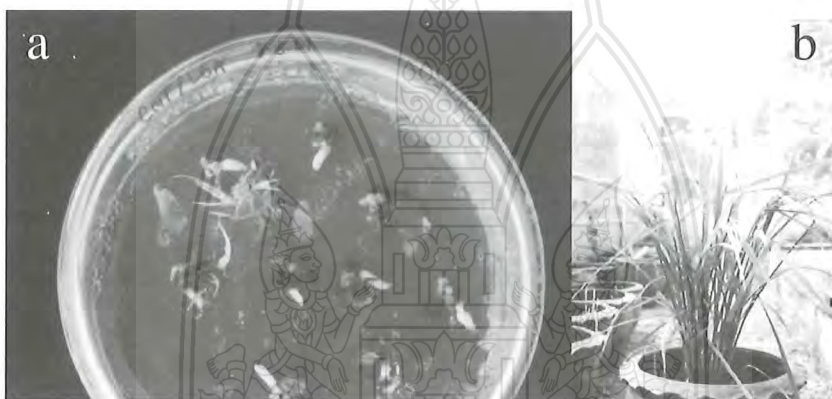
การศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดยอะโกรแบคทีเรีย

ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสและเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ผ่านอะโกรแบคทีเรีย พบว่าภายหลังการทำให้เมล็ดและแคลลัสติดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นเวลา 2 วัน สังเกตพบอะโกรแบคทีเรียเจริญรอบๆ เมล็ดและแคลลัส และเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 3 ในระยะนี้เมล็ดบางส่วนเจริญเป็นยอดอ่อนสีเขียวและก้านแคลลัสสีเหลืองขนาดเล็ก แต่เมล็ดบางส่วนไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ ภายหลังการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกจากเมล็ดและแคลลัสด้วยสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิมที่เติมซีโฟแทกซิมเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาลและตาย แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปถึงสัปดาห์ที่ 3 และ 4 สังเกตพบแคลลัสเจริญขึ้นใหม่รอบๆ ก้อนแคลลัสเดิม และเมื่อนำแคลลัสที่รอดชีวิตไป

เลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินพบว่าแคลลัสเจริญเป็นต้นใหม่ได้และสามารถย้ายต้นข้าวออกจากหลอดทดลองและนำไปปลูกในเรือนเพาะชำได้ (รูปที่ 3)

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสข้าวที่ได้รับการส่งถ่ายยีนผ่านอะโกรแบคทีเรีย และต้นข้าวที่เจริญจากแคลลัสที่รอดชีวิต พบว่าทั้งแคลลัสและใบข้าวแสดงสีฟ้าเป็นบางส่วน (รูปที่ 4) สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์การทำ PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิส เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นข้าวที่ทนทานต่อกานามัยซินเป็นต้นแบบ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 189 คู่เบสปรากฏบนแผ่นเจล แต่ไม่พบมีแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบจากต้นข้าวควบคุมเป็นต้นแบบ (รูปที่ 5)

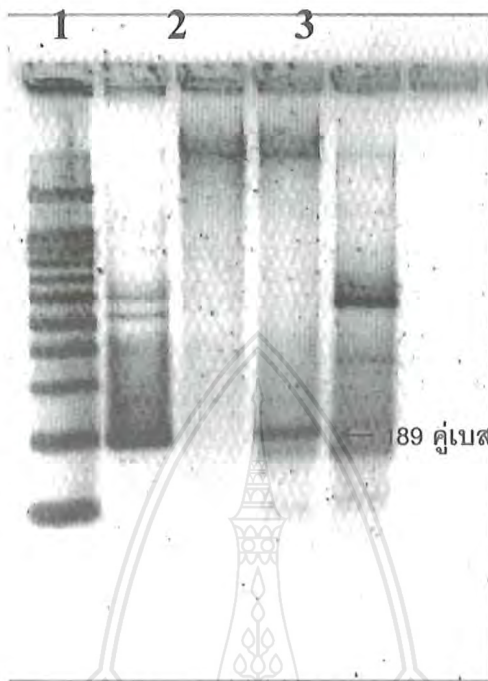


รูปที่ 3 a. ต้นข้าวที่เจริญจากแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารที่เติมกานามัยซิน 50 มิลลิกรัม/ลิตร
b. ต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมชยันต 1 (อายุ 3 เดือน) ที่ทนทานต่อกานามัยซิน



รูปที่ 4 ผลการตรวจสอบการถ่ายถอดยีนโดยวิธี *gus* assay

- แคลลัสข้าวที่ได้รับการถ่ายถอดยีนจากอะโกรแบคทีเรีย EHA 105 (pCambia 1301)
- แคลลัสข้าวที่ได้รับการถ่ายถอดยีนจากอะโกรแบคทีเรีย LBA4404 (pBI121)
- ใบจากต้นข้าวชยันต 1 ที่ทนทานต่อกานามัยซิน



รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์การทำ PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. ดีเอ็นเอเปรียบเทียบ 100 คู่เบส
2. พลาสมิด PBI121
3. ต้นข้าวชัยนาท 1 ควบคุม
4. ต้นข้าวฝักฝังพันธุกรรม ชัยนาท 1 ที่ทนทานต่อกานามัยซิน

บทสรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ต่อการชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้เจริญเป็นแคลลัสพบว่า อาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 % และ 2, 4-D ความเข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการชักนำเมล็ดข้าวให้เจริญเป็นแคลลัส โดยทำให้การสร้างแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 92% เมล็ดข้าวสร้างแคลลัสจากบริเวณคัพภะและแคลลัสจากคัพภะข้าวเจริญมาจากเนื้อเยื่อ scutellum (Maeda, 1980) 2, 4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซินและนิยมใช้เพื่อชักนำคัพภะข้าวให้สร้างแคลลัส โดยความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่เหมาะสมต่อการชักนำการสร้างแคลลัสจากคัพภะข้าวแตกต่างกันในข้าว

แต่ละสายพันธุ์ ในการทดลองพบว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 18 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสสูงที่สุด ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Darshan et al. (1991) ซึ่งรายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ลิตร เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดข้าวสายพันธุ์ Bg94-1 ให้สร้างแคลลัส มีรายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวบนอาหารที่เติม 2, 4-D ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้ Rueb et al. (1994) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวจากไปนิกาพันธุ์ Taipei 309 บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร และมีการสร้างแคลลัสเท่ากับ 98%

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการสร้างต้นใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 พบว่าอาหารสูตร N₆ ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 %, NAA 2.5 ไมโครโมลาร์ และ BA 13.5 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ โดยมีการเจริญเป็นต้นเท่ากับ 60% ต้นที่เจริญจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรไม่มีการเจริญของราก และสามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงอาจกล่าวได้ว่าแคลลัสเจริญเป็นต้นโดยกระบวนการสร้างอวัยวะ (organogenesis) ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นและจำนวนต้นต่อแคลลัสเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนระหว่าง BA และ NAA ที่เพิ่มขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง Oinam and Kothari (1993) รายงานความสำเร็จในการชักนำแคลลัสข้าวอินดิกาพันธุ์ Chambal, CH1039 และ Himhan ให้เจริญเป็นต้นได้ บนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร Zhang et al. (1996) ศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวจากโปนิกาพันธุ์ Aikoku และ Sen-ichi ให้เจริญเป็นต้นใหม่ และรายงานว่าสามารถชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นใหม่ได้สูงกว่า 85% บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KI ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/ลิตร

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสและเมล็ดข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 โดยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) พบว่าสามารถสร้างแคลลัสและต้นข้าวแปลงพันธุ์ที่ทนทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ การทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการใช้แคลลัสและคัพเพาะข้าวเป็นชิ้นส่วนพืชสำหรับการถ่ายยีน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hiei et al. (1994) ซึ่งศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Tsukinokari, Asanihikar และ Koshihikar ผ่านอะโกรแบคทีเรีย ได้รายงานการใช้คัพเพาะอ่อนและแคลลัสที่เจริญจากบริเวณ scutellum ของข้าวเป็นเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีนและ

ประสบความสำเร็จในการสร้างต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ทนทานต่อสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน Aldemita and Hodge (1996) รายงานการทำให้คัพเพาะอ่อนของข้าวจากโปนิกาพันธุ์ Radon และข้าวอินดิกาพันธุ์ IR72 และ TCS10 ติดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และประสบความสำเร็จในการสร้างต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) และ EHA105 (pCAMBIA1301) เป็นพาหะแบบ binary vector ซึ่ง Chan et al. (1992) รายงานความสำเร็จในการใช้อะโกรแบคทีเรีย LBA4404 (pBI121) ในการถ่ายยีนที่มีสมบัติทนทานต่อกานามัยซินเข้าสู่แคลลัสข้าวอินดิกาพันธุ์ Taichung Native 1 ได้ เวกเตอร์ที่ใช้ในการถ่ายยีนครั้งนี้มีโปรโมเตอร์ CaMV35S ควบคุมการแสดงออกของยีนคัดเลือก (*nptII* และ *hptII*) และยีนรายงานผล (*gus*) CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในพืชส่วนใหญ่และนำมาใช้เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนคัดเลือกและยีนรายงานผลในข้าวหลายชนิด ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสและต้นข้าวแสดงให้เห็นว่าโปรโมเตอร์ชนิดนี้ทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Chan et al. (1992), Park et al. (1996) และ Cheng et al. (1998) รายงานความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยอะโกรแบคทีเรีย และมีโปรโมเตอร์ CaMV35S ควบคุมการแสดงออกของยีนคัดเลือกและยีนรายงานผล

ในการถ่ายยีนสู่พืชนิยมนำยีนที่มีสมบัติทนทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชมาใช้เป็นยีนคัดเลือก ซึ่งการศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 โดยอะโกรแบคทีเรียในครั้งนี้ได้นำยีน *npII* ที่มีสมบัติทนทานต่อ กานามัยซิน และยีน *hptIII* ที่มีสมบัติทนทานต่อไฮโกรมัยซินมาใช้เป็นยีนคัดเลือก ยีน *nptII* มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ neomycin phosphotransferase II ซึ่งสามารถยับยั้งการแปลรหัสและลอกรหัสเพื่อการสร้างโปรตีนในพืชและทำให้พืชตาย มีรายงานความสำเร็จในการใช้ยีนที่

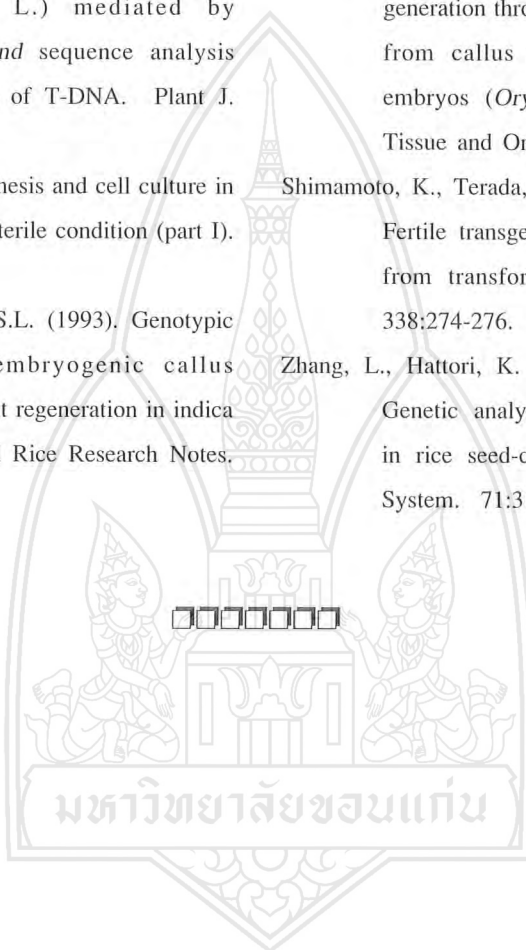
มีสมบัติทนทานต่อกานามัยซินสำหรับถ่ายถอดยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าวโพด (Gould et al., 1991), ข้าวสาลี (Hauptmann et al., 1998) และข้าว (Peng et al., 1992) ในการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือกแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ชยันต 1 ที่ทนทานต่อกานามัยซินได้ โดยใช้กานามัยซินที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับยีน *hpt II* มีรหัสสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ hygromycin phosphotransferase ที่ยับยั้งการสร้างสายเปปไทด์ให้ยาวขึ้น (peptide chain elongation) ในพืชมีรายงานความสำเร็จในการใช้ยีนนี้เป็นยีนคัดเลือกในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าว (Dekeyser et al., 1989; Shimamoto et al., 1989) และข้าวโพด (Hayashimoto et al., 1990)

ยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ 5-bromo-4-chloro-indole- β -D-glucuronides ให้เป็นอนุพันธ์อินโดลิล (indoyl derivative) ที่มีสีฟ้า X-gluc assay buffer ที่ใช้ในขั้นตอนตรวจสอบผลการถ่ายถอดยีนด้วยวิธี *gus* assay มีองค์ประกอบเป็น glucuronides ดังนั้นผลการตรวจสอบแคลลัสและต้นข้าวแปลงพันธุ์ซึ่งมีการสังเคราะห์เอนไซม์ β -glucuronidase เนื้อเยื่อพืชจึงเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ในการตรวจสอบผลการถ่ายถอดยีนโดยเทคนิค PCR พบว่าตัวอย่างที่สกัดจากต้นข้าวที่ทนทานต่อกานามัยซินที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 189 คู่เบส ซึ่งแสดงว่ามียีนที่ส่งถ่ายแทรกอยู่ในโครโมโซมพืช

เอกสารอ้างอิง

- Aldemita, R.R. and Hodge, T.K. (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta*. 199:612-617
- Chan, M.T., Lee, T.M. and Chang, H.H. (1992). Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol.* 33:577-583.
- Chan, M.T., Chang, H.H., Ho, S.L., Tong, W.F. and Yu, S.M. (1993). *Agrobacterium tumefaciens* production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.* 22:491-506.
- Cheng, X.Y., Sardana, R., Kaplan, H. and Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(c) gene are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 9:2767-2772.
- Darshanie, P.R., Mendis, M.H. and Jayawaardene, S.D.G. (1991). Establishment of callus culture in Bg-94-1: a commercial cultivated rice in Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka.* 19:163-170.
- Dekeyser, R., Claes, B., Marichat, M., Montagu, M.V. and Caplan, A. (1989). Evaluation of selectable marker for rice transformation. *Plant Physiol.* 90:217-223.
- Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E.C., Peterson, G. and Smith, R.H. (1991). Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol.* 95:426-434.
- Hauptmann, R.M., Vasil, V., Ozias-Akin, P., Tabaeizadeh, Z., Roger, G., Fraley, R.T., Horch, R.B. and Vasil, I.R. (1998). Evaluation of selectable marker for obtaining stable transformations in the Gramineae. *Plant Physiol.* 86:602-606.

- Hayashimoto, A., Li, Z., and Murai, N. (1990). A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiol.* 93:857-863.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994). Efficiency transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
- Maeda, E. (1980). Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition (part I). *JAQR.* 14:4-8.
- Oinam, G.S. and Kothari, S.L. (1993). Genotypic difference in embryogenic callus formation and plant regeneration in indica rice. *International Rice Research Notes.* 18:9-10
- Park, S.H., Pinson, S.M.R. and Smith, R.H. (1996). T-DNA integration into genomic DNA of rice following *A. tumefaciens* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148.
- Rueb, S., Lenemana, M., Schlperoort, R.A. and Hensgens, L. (1994). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 32:259-264.
- Shimamoto, K., Terada, R., and Izawa, T. (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplast. *Nature.* 338:274-276.
- Zhang, L., Hattori, K. and Zhang, L. (1996). Genetic analysis of regeneration ability in rice seed-callus. *Gene and Genetic System.* 71:313-317.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการ ย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ปกติ มีช่วงห่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน พิมพ์ลงในกระดาษขาว A 4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 2 ชุด
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะต้องสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนและภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ตลอดทั้งการเขียนตัวสะกด การันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน
7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์
8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก่ใจความเฉพาะตอนในบทความ
9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม
10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

อภิสิทธิ์สำหรับการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานั้น ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้ในเนื้อหาเท่านั้น

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.) ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

ชื่อหน่วยราชการ. (เลขปี พ.ศ. หรือ ค.ศ.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์ : โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์.

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่) : เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่) : เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย

หมายเหตุ

- กรณีที่เป็นการอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จุลสาร หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
- กรณีที่ผู้เขียน 2 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เติมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
- กรณีที่ผู้เขียนมากกว่า 2 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ (เฉพาะในเนื้อหาเท่านั้น)
- ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น

