บทที่ 1
บทนำ

ข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย และโลก เนื่องจากข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนที่สำคัญในการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์และมนุษย์ นอกจากนี้มนุษย์ยังนำข้าวโพดไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อีกมากมาย เช่น แป้ง น้ำมัน อาหารสัตว์ กลูโคสไซรับ เครื่องดื่ม อาหาร ยา และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีกมากกว่า 500 ชนิด จากรายงานผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทย โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ตารางที่ 1.1) พบว่าประเทศไทยผลิตข้าวโพดได้ประมาณปีละ 4 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 4 พันล้านบาท แต่อย่างไรก็ตามแนวโน้มของการส่งออกจะลดลง ในขณะที่มีการใช้ในประเทศเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ แป้ง และน้ำมัน

อาหารที่สะสมอยู่ในเมล็ดข้าวโพดประกอบด้วย แป้ง 72 เปอร์เซนต์ ไขมัน 5 เปอร์เซนต์ และโปรตีน 10 เปอร์เซนต์ โดยประมาณ แต่โปรตีนของข้าวโพดจะมีคุณค่าทางอาหารต่ำเมื่อเทียบกับโปรตีนจากสัตว์ ทั้งนี้เพราะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นบางตัว เช่น ไลซีน ทรีโอนีน ทริฟโตเฟน และเมทไธโอนีน ในปริมาณต่ำ ดังนั้นในการนำข้าวโพดไปใช้เลี้ยงสัตว์จึงจำเป็นต้องเสริมโปรตีนจากอาหารแหล่งอื่น เช่น ปลาป่น ถั่วเหลือง เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องเติมกรดอะมิโนจำเป็นบางตัว เช่น ไลซีน เมทไธโอนีน ลงไปด้วย ดังนั้นจึงทำให้ต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์สูงขึ้น เนื่องจากอาหารเสริมโปรตีนและกรดอะมิโนที่เติมลงไปมีราคาสูงกว่าข้าวโพดมาก ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่มคุณภาพ และปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวโพดให้เพิ่มสูงขึ้นได้ ก็จะสามารถลดโปรตีนและกรดอะมิโนเสริมได้ อันเป็นการทำให้ต้นทุนของอาหารเลี้ยงสัตว์ต่ำลงได้ด้วย

หลักการทั่วไปที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้แก่ วิธีการผสมเกสรแล้วคัดเลือกพันธุ์ โดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะตามประสงค์ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการในรุ่นลูก ด้วยวิธีการนี้ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของข้าวโพดไทยที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการใช้ในประเทศ เช่น พันธุ์สุวรรณ 3 , KTX 3101, KSX 2301 ซึ่งมีลักษณะที่ดีคือ มีผลผลิตสูงต้านทานต่อโรคราสนิมและราน้ำค้าง ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของข้าวโพด ข้าวโพดเหล่านี้ยังทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีอีกด้วย

ตารางที่ 1 ผลผลิตการใช้และการส่งออกของข้าวโพดไทย ปีพ.ศ. 2529-34

ปี พ.ศ.	ผลผลิต (ล้านตัน)	เฉลี่ย/ไร่ (ก.ก)	ใช้ในประเทศ (ล้านตัน)	ส่งออก (ล้านตัน)	มูลค่าส่งออก (ล้านบาท)
2529-30	4.309	380	1.368	2.920	6,248
2530-31	2.780	328	2.220	0.810	2,098
2531-32	4.675	419	2.400	1.573	5,135
2532-33	4.393	411	2.700	1.226	4,294
2533-34	3.722	385	2.900	1.215	3,809

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปรับปรุงพันธุ์ของข้าวโพดไทย ส่วนใหญ่สนใจในด้านการเพิ่มปริมาณผลผลิต และการต้านทานโรค ส่วนในด้านการปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนยังได้รับความสนใจน้อยอยู่ ความพยายามในการที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด เพื่อให้มีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น ได้กระทำมาเป็นเวลานานแล้วในต่างประเทศ Hopgin (1899)ใช้วิธีการคัดเลือกแบบฝักต่อแถว (ear to row) สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มเป็น 19.45 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้ต้องทำการคัดเลือกฝักให้ได้ลักษณะที่ต้องการจำนวน 45 รอบการคัดเลือก ใช้เวลายาวนานถึง 40 ปี Dudley และคณะ (1972) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดจนได้สายพันธุ์ซึ่งสามารถเพิ่มระดับโปรตีนได้สูงถึง 26.6 เปอร์เซนต์ โดยใช้เวลา 70 รอบการคัดเลือก จะเห็นได้ว่าถึงแม้วิธีการผสมเกสรแล้วคัดเลือกพันธุ์นี้ จะก่อให้เกิดพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะดีหลายประการก็ตาม แต่ก็เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการปรับปรุงยาวนาน ต้องใช้พื้นที่ปลูกมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและแรงงานสูง และไม่ประสบความสำเร็จเสมอไป ตลอดจนยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นบางตัวให้สูงขึ้นตามต้องการได้

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้รับการวิจัย และพัฒนาจนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งกระทำได้หลายวิธีด้วยกัน วิธีหนึ่งที่นิยมคือ การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยทำให้เกิดการแปรผันที่เรียกว่า somaclonal variation หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ในช่วงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสังเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้วิธีการดังกล่าวจะมีผลให้มีการเปลี่ยนแปลงไปจนถึงระดับพันธุกรรมได้ การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์มีข้อได้เปรียบในการคัดเลือกพันธุ์ที่ต้องการ เนื่องจากสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้จากเซลล์จำนวนมากในครั้งเดียว อัตราการเกิด somaclonal variation และการกลายพันธุ์สูงกว่าในเซลล์ธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดลักษณะใหม่จะสามารถตรวจพบและติดตามได้ง่าย ในแง่ของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาวะของเซลล์เพาะเลี้ยงก็สามารถชักนำให้เกิดได้ โดยสารก่อกลายพันธุ์มากมายหลายชนิด (Flick, 1983 ; Dixon, 1987)

เมทไธโอนีน (methionine) เป็นกรดอะมิโนจำเป็นของสัตว์ที่อยู่ในวิถีร่วมของการสังเคราะห์จากกรดแอสปาติก (aspartate family) วิถีการสังเคราะห์จะถูกควบคุมโดยระบบยับยั้งแบบป้อนกลับ (feedback regulation) คาดว่าเอนไซม์ตัวแรกและตัวที่ 3 ในวิถี คือ aspartokinase และ homoserine dehydrogenase ซึ่งสามารถถูกยับยั้งแบบป้อนกลับได้ มีส่วนเกี่ยวข้องอย่างสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์ ไลซีน, ทรีโอนีน และ เมทไธโอนีน

ดังนั้นการจะสร้างสายพันธุ์ข้าวโพดให้สังเคราะห์เมทไธโอนีนให้สูงกว่าปกติ จะต้องเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระบบการสร้างและควบคุมวิถีการสังเคราะห์ของเมทไธโอนีนไปจากเดิม (Gengenbatch et al.,1978)

มีรายงานว่าการเติมเมทไธโอนีน หรืออะนาล็อก (analog) ของเมทไธโอนีนในระดับความเข้มข้น และสภาวะที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยง จะมีผลทำให้กระบวนการสังเคราะห์เมทไธโอนีนถูกยับยั้ง เซลล์ที่จะเจริญได้จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงระบบหรือวิถีการเมตาบอลิสม (metabolism) บางอย่าง เพื่อที่จะต่อต้านการถูกยับยั้งด้วยเมทไธโอนีน หรืออะนาล็อก คือ จำเป็นต้องทำให้เมทไธโอนีนไม่ถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นสารตัวอื่น และต้องสามารถสร้างเมทไธโอนีนเพิ่มขึ้นในปริมาณที่สูงกว่าปกติ เพื่อที่จะสามารถแข่งขันกับอะนาล็อกของเมทไธโอนีน ในการที่จะแย่งสอดแทรกเข้าสู่สายของโพลีเปปไตด์ หรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการขนส่งเพื่อป้องกันไม่ให้อะนาล็อกถูกนำเข้าสู่เซลล์ (Flick, 1983 ; Alix, 1982)

<u>การตรวจเอกสาร</u>

ข้าวโพดเป็นพืชในวงศ์ (family) Gramineae เผ่า (tribe) Maydeae สกุล (genus) Zea และชนิด (species) Mays ลักษณะสำคัญของพืชในเผ่า Maydeae คือ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจะอยู่แยกกัน แต่อยู่ภายในต้นเดียวกัน ระบบรากของข้าวโพดเป็นแบบ fibrous root system ลำต้นตั้งตรงค่อนข้างกลมแต่จะเรียวเล็กขึ้นไปทางยอด ประกอบด้วย ข้อ (node) และปล้อง (internode) ปล้องที่โคนของลำต้นจะมีขนาดสั้นกว่าปล้องที่อยู่ถัดไป ช่อดอกตัวผู้ (staminate inflorescence) เรียกว่า tassel จะอยู่ส่วนบนของลำต้น ส่วนช่อดอกตัวเมีย (pistillate inflorescence) เรียกว่า ฝัก (ear) เกิดจากตาที่มุมใบประมาณใบที่ 7 นับจากใบแรกจากยอดลงมา ดอกที่อยู่บริเวณตอนกลางของฝักจะได้รับการผสมก่อนดอกที่อยู่ตอนโคนและตอนปลายของฝัก ดอกที่ผสมก่อนจะได้เปรียบในการสะสมอาหาร ดังนั้นเมล็ดตอนกลางของฝักจึงมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ดที่อยู่ตอนปลายและโคนฝัก ลักษณะการพัฒนาและการเจริญเติบโตของข้าวโพดจะแตกต่างกันตามพันธุ์ และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิ ความยาวนานของกลางวัน และความอุดมสมบูรณ์ของดิน

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u> เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อพืชถูกพัฒนาขึ้นได้โดยอาศัยความสามารถของเซลล์พืชที่พร้อมจะเจริญจากเซลล์ปกติที่เป็น vegetative cell ไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยา เคมี กายวิภาค ตลอดจนทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์ คือการเกิดยอดและราก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มจากการนำชิ้นส่วนของพืชเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ วิตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญ ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงซึ่งได้แก่ แสง, อุณหภูมิ และความชื้น (Murashige, 1974) ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจแบ่งได้เป็นหลายประเภทดังนี้คือ

1. ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเกิดเป็นยอด หรือรากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชบางชนิดอาจเกิดเป็นรากและยอดได้ง่าย ในขณะที่พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นได้ยาก แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม และถึงแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็ให้ผลที่แตกต่างกันได้ด้วยเช่นกัน

2. สภาพของเนื้อเยื่อ (explant factor) โดยปกติเนื้อเยื่อของพืชจะมีการเจริญและพัฒนาอยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางสรีรวิทยา, ชีวเคมี, ระดับและชนิดของฮอร์โมนในเนื้อเยื่อ ดังนั้นระดับความสมดุลของฮอร์โมนที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphogenesis) ของเนื้อเยื่อจึงเปลี่ยนแปลงไปด้วย พืชที่อยู่ในระยะเริ่มต้นของการพัฒนา เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) จะสามารถเจริญได้ดีและควบคุมการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เนื่องจากยังไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เฉพาะ (cell differentiation) ส่วนเนื้อเยื่อที่ได้เปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะแล้วนั้นหากต้องการทำให้เปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อชนิดอื่น ต้องเปลี่ยนกลับมาเป็นเนื้อเยื่อเจริญเสียก่อน ซึ่งมีกระบวนการที่ซับซ้อนและประสบความสำเร็จได้ยากกว่าอีกด้วย (Li et al., 1985; Dixon, 1987)

3. ปัจจัยของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (nutrient medium factor) ส่วนประกอบของอาหารบางชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกับ morphogenesis เช่นการให้ไนโตรเจนในรูปของ NH_4^+ ปริมาณมากจะทำให้เกิดการพัฒนาแบบเอมบริโอเจเนซีส (embryogenesis) มากกว่าออกาโนเจเนซีส (organogenesis) (ไพบูลย์, 2521)

4. สารควบคุมการเจริญ (plant growth regulator) การเกิดเป็นราก, ต้น หรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของปริมาณ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ถ้าออกซินและไซโตไคนินมีอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและราก

ที่สมบูรณ์ ถ้าอัตราส่วนของออกซินสูงกว่าไซโตไคนิน เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นก้อนแคลลัสและราก ถ้าอัตราส่วนของไซโตไคนินสูงกว่าออกซิน จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นยอด (Miller และ Skoog , 1957)

5. สภาวะในการเพาะเลี้ยง (culture environment) ได้แก่การให้แสง และอุณหภูมิ โดยทั่วไปพบว่าแสงไม่จำเป็นต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อ แต่จำเป็นสำหรับการพัฒนาของยอดจากแคลลัส อุณหภูมิโดยทั่วไปจะควบคุมไว้ที่ประมาณ 25° C (Dixon, 1987)

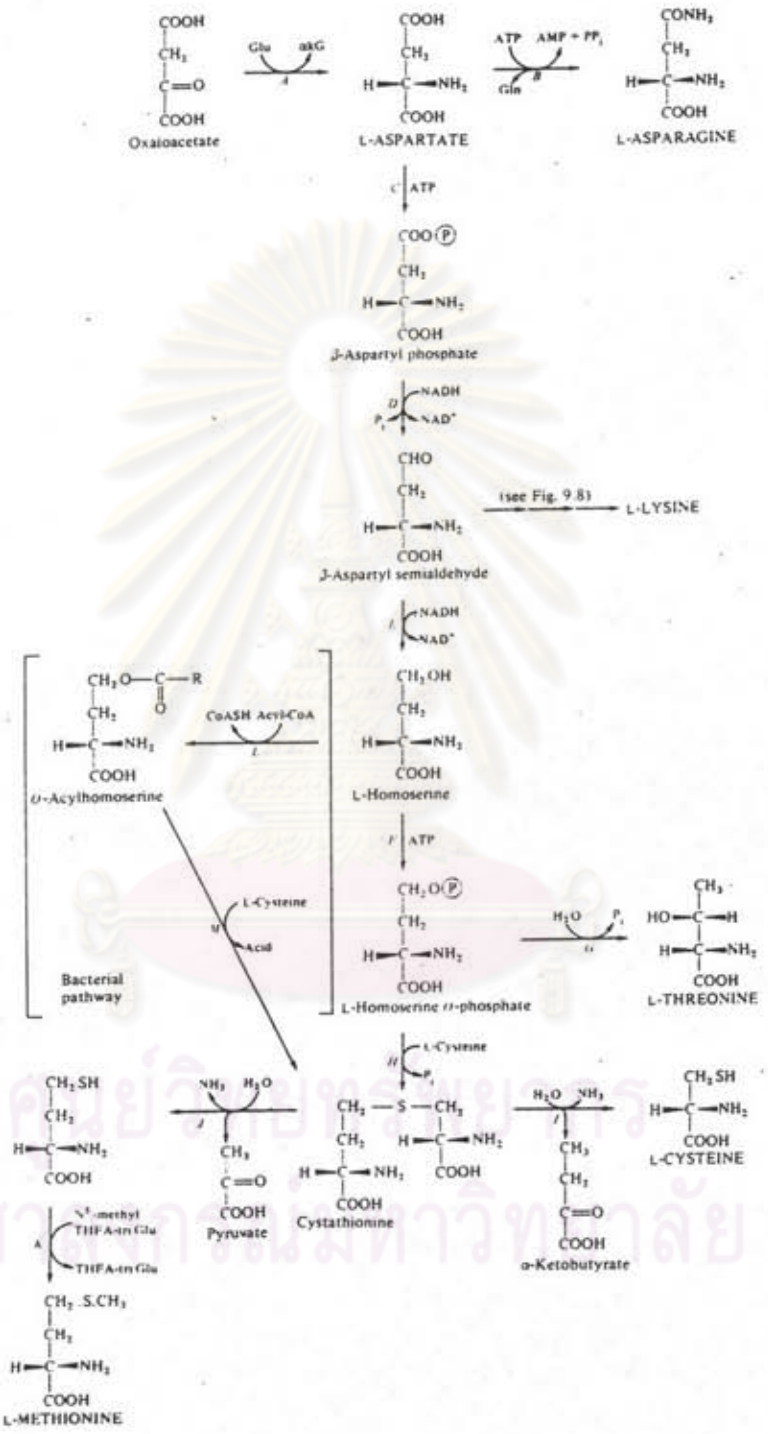
ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงโดยชักนำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส (callus) ซึ่งสามารถนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (plant regeneration) โดยมีกระบวนการที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ

1. ออกาโนเจเนซีส เป็นการเจริญและพัฒนาไปเป็นยอด หรือ ราก ที่เกิดจากการรวมตัวของ meristematic cell ไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอด หรือราก การพัฒนาของยอด และราก จะเป็นอิสระไม่ขึ้นแก่กัน ขึ้นอยู่กับว่าจะได้รับการกระตุ้นให้เจริญไปในทิศทางใด และระบบยอดและรากอาจจะเชื่อมต่อกันหรือไม่เชื่อมต่อกันก็ได้ ซึ่งหากเชื่อมต่อกันได้ก็สามารถได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ เช่นเดียวกัน

2. เอมบริโอเจเนซีส เป็นการพัฒนาที่มีกระบวนการคล้ายกับ zygotic embryo คือ การพัฒนาจะเริ่มต้นจาก embryo-like structure ที่เรียกว่า somatic embryo ซึ่งพัฒนามาจาก somatic cell ลักษณะการพัฒนาไปเป็นยอดและรากจะเป็นแบบ bipolar คือ ปลายด้านหนึ่งจะเจริญไปเป็นยอดและอีกด้านหนึ่งจะเจริญไปเป็นราก ยอดและรากจะมีการเชื่อมต่อกันของระบบท่อลำเลียงอย่างสมบูรณ์ (Dixon, 1987)

แคลลัสที่สามารถหวนกลับเป็นต้นพืชทั้งต้นได้เรียกว่า เอมบริโอเจนิกแคลลัส (embryogenic callus) โดยที่กระบวนการพัฒนาไปเป็นต้นอาจเป็นแบบออกาโนเจเนซีส หรือเอมบริโอเจเนซีส ก็ได้ ส่วนแคลลัสที่ไม่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้เรียกว่า นอนเอมบริโอเจนิกแคลลัส (non-embryogenic callus) ซึ่งอาจจะพัฒนาไปเป็นรากได้เท่านั้น

<u>การสังเคราะห์เมทไธโอนีน (methionine synthesis)</u> เมทไธโอนีน (methionine) เป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) สำหรับสัตว์ ในเซลล์ที่สังเคราะห์เมทไธโอนีนได้ เมทไธโอนีนจะถูกสังเคราะห์ในวิถีร่วมของการสังเคราะห์จากกรดแอสปาติก (aspartate family) (รูปที่ 1.1) ซึ่งวิถีการสังเคราะห์นี้จะประกอบด้วยกรด



รูปที่ 1.1 วิถีการสังเคราะห์ของกรดอะมิโนที่อยู่ในวิถีร่วมของกรดแอสปาติก (aspartate family) (Goodwin และ Mercer, 1983)

อะมิโนที่สำคัญอื่น ๆ ในวิถีหลายชนิด คือ ไลซีน (lysine), ทรีโอนีน (threonine) และไอโซลิวซีน (isoleusine) การควบคุมการสังเคราะห์ของกรดอะมิโนในวิถีนี้เป็นระบบยับยั้งแบบป้อนกลับ คือ เมื่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ในวิถีสูงถึงขีดหนึ่งจะกลับมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในวิถี เป็นผลให้การสังเคราะห์หยุดลง จากการศึกษาในข้าวโพด พบว่า เอนไซม์ aspartokinase จะถูกยับยั้งได้ด้วยไลซีน, homoserine dehydrogenase ถูกยับยั้งได้ด้วยทรีโอนีน และ aspartate semialdehyde dehydrogenase ถูกยับยั้งด้วยเมทไธโอนีน แต่ต้องใช้ความเข้มข้นสูง การเติมไลซีนและทรีโอนีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้การเจริญถูกยับยั้ง เนื่องจากเซลล์พืชจะขาดเมทไธโอนีน และเมื่อเติมเมทไธโอนีน หรือ โฮโมซีรีน (homoserine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเมทไธโอนีนลงไปในอาหาร จะสามารถป้องกันการยับยั้งการเจริญได้ แสดงให้เห็นว่าจุดที่เกิดการยับยั้งแบบป้อนกลับคือเอนไซม์ 3 ตัวแรกในวิถีที่ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดแอสปาติกไปเป็นโฮโมซีรีน (Bryan, 1969 ; Cheshire และ Miflin, 1975 ; Gengenbatch et al., 1978)

จากการที่วิถีการสังเคราะห์ถูกควบคุมด้วยระบบยับยั้งแบบย้อนกลับนี้ เป็นที่คาดกันว่าถ้าทำให้ระบบการยับยั้งนี้เสียไป โดยทำให้เอนไซม์สามารถต้านทานต่อการถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ในวิถีจะทำให้ ไลซีน, ทรีโอนีน, ไอโซลิวซีน หรือเมทไธโอนีน ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นได้ และเมื่อนำไปชักนำให้เกิดต้น ก็จะได้พืชที่สามารถให้เมล็ดที่มีปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวสูงขึ้นด้วย

<u>เอทไธโอนีน (ethionine)</u> เอทไธโอนีนเป็น s-ethyl analog ของเมทไธโอนีน ซึ่งสามารถแข่งขันกับเมทไธโอนีนในการทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้ (competitive inhibition) ทำให้มีผลกระทบต่อวิถีเมตาบอลิสมของเมทไธโอนีนในระบบต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน, DNA, RNA และปฏิกริยาการเติมหมู่เมทธิล (methyl group) อิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (eucaryote) พอสรุปได้ดังต่อไปนี้ดังต่อไปนี้

1. ยับยั้งการสังเคราะห์เมทไธโอนีนในกระบวนการตามปกติได้ โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนในวิถีที่เริ่มต้นจากกรดแอสปาติก ตามระบบการยับยั้งแบบป้อนกลับ

2. เอทไธโอนีนสามารถยับยั้งการสอดแทรกของเมทไธโอนีน เข้าสู่สายของโพลี-เปปไตด์ตามปกติ และสามารถสอดแทรกเข้าสู่สายของโพลีเปปไตด์แทนเมทไธโอนีนได้เช่นกัน โปรตีนที่มีเอทไธโอนีนเป็นองค์ประกอบแทนเมทไธโอนีน อาจจะเสียคุณสมบัติไป หรือยังคงทำ

หน้าที่เหมือนเดิมก็ได้

3. เอนไซม์ s-adenosyl methionine synthase สามารถสังเคราะห์ s-adenosyl ethionine (SAE)ได้ แต่ในอัตราที่ต่ำกว่า s-adenosyl methionine (SAM) SAE สามารถทำหน้าที่เป็นตัวเติมหมู่เอทธิล (ethyl group) ให้กับโปรตีน หรือ DNA รวมทั้งสามารถยับยั้งการสังเคราะห์และการทำหน้าที่ของ SAM ได้

4. ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ribosomal subunit และทำให้เกิดการแยกตัวของ polysome เป็นผลให้เกิดความผิดปกติของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้

5. ยับยั้งกระบวนการ DNA replication เอทไธโอนีนมีคุณสมบัติเป็น mutagen ทั้งนี้เนื่องจากเข้าไปเกี่ยวข้องกับระบบการสังเคราะห์โปรตีน และ DNA อย่างไรก็ตามอิทธิพลของเอทไธโอนีนจะถูกยับยั้งได้ด้วยเมทไธโอนีน ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่ทำให้เอทไธโอนีนต่างจาก mutagen ตัวอื่น ๆ (Alix, 1982) จากการที่เอทไธโอนีนสามารถขัดขวางการทำงานของเมทไธโอนีนในลักษณะของการยับยั้งแบบแข่งขัน และอิทธิพลของเอทไธโอนีนจะถูกยับยั้งด้วยเมทไธโอนีน นี้ ถ้าสามารถสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนได้แสดงว่าเซลล์พืชย่อมต้องมีการเปลี่ยนแปลงกลไกต่าง ๆ เพื่อที่จะสังเคราะห์เมทไธโอนีนให้สูงขึ้นมากพอจะแข่งขันกับเอทไธโอนีนได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลให้ได้สายพันธุ์พืชที่สามารถสังเคราะห์เมทไธโอนีนได้สูงกว่าปกติ

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพด (Tissue culture of corn)</u> มีรายงานว่ามีผู้พยายามทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพดมาตั้งแต่ปี 1949 แต่สามารถประสบความสำเร็จครั้งแรกตามผลงานของ Green และ Phillips (1975) โดยทำการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของสายพันธุ์ A 188 บนอาหารสูตร MS และวิตามินกับกรดอะมิโนของอาหารสูตร Straus ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact จะเกิดจาก scutellum และสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ โดยผ่านกระบวนการออกาโนเจเนซิสเมื่อลด 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยงลงเหลือ 0.5 มก./ล. อายุของคัพภะอ่อนที่เหมาะสมคือ 18 วันหลังผสม หรือมีขนาดคัพภะประมาณ 3 มม.

Vasil และคณะ (1983) ศึกษาการเกิดแคลลัสจากด้าน embryonic axis ของคัพภะอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 - 1.0 มก./ล. และซูโครส 6 - 12 เปอร์เซนต์ เพาะเลี้ยงในที่มืด พบว่าสามารถเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact จากด้าน

embryonic axis ได้ 5-15 เปอร์เซนต์ในสายพันธุ์ต่าง ๆ แต่จะไม่พบแคลลัสเกิดขึ้นจาก scutellum ซึ่งสัมผัสกับอาหารเลย การชักนำให้เกิดต้นทำได้โดยย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D 0.1 มก./ล. และ BAP หรือ kinetin 0.1 มก./ล. ให้แสง 16 ชม./วัน การพัฒนาไปเป็นต้นผ่านกระบวนการเอมบริโอเจเนซีส

Vasil และคณะ (1984) พบว่า เอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact ที่ชักนำจากอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานานจะมีชิ้นแคลลัสประมาณ 25-30 เปอร์เซนต์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยากลายเป็นแคลลัสที่มีเนื้อหลวม (friable) ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้นานกว่า 1 ปี และยังคงมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้โดยผ่านกระบวนการเอมบริโอเจเนซีส เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 16 ชม./วัน

Kamo และคณะ (1984) ได้พัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสจากคัพภะอ่อนของสายพันธุ์ A 188 ได้อย่างมีประสิทธิภาพถึง 90 เปอร์เซนต์ โดยใช้อาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 - 1.0 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มืด ลักษณะของแคลลัสจะเป็นชนิด friable เกิดขึ้นจาก scutellum ขนาดของคัพภะที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสคือ 1.7 มม. การชักนำให้เกิดต้นทำได้โดยย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่เสริมฮอร์โมน และให้แสง 16 ชม./วัน นอกจากนี้ยังพบว่า L-proline สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส และการพัฒนาย้อนกลับเป็นต้นใหม่ของข้าวโพดจากแคลลัส โดยจะมีผลมากในอาหารสูตร N_6 แต่จะไม่ค่อยมีผลในอาหารสูตร MS

Lowe และคณะ (1981) ทำการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์ B73 บนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. และ ซูโครส 12 เปอร์เซนต์ ลักษณะของแคลลัสเป็นแบบ compact สีขาว เกิดขึ้นจากส่วนของ scutellum เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และซูโครส 2 เปอร์เซนต์ จะมีการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นผ่านพัฒนาการแบบออกาโนเจเนซีส หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อเนื่องเป็นเวลามานานกว่า 2 ปี จะพบส่วนของเนื้อเยื่อที่มีลักษณะหลวม ชุ่มน้ำ (friable) และมีการเจริญที่รวดเร็วกว่าชนิด compact เนื้อเยื่อส่วนนี้สามารถแยกไปทำการเพาะเลี้ยงและสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้โดยผ่านกระบวนการเอมบริโอเจเนซีส

Rhodes และคณะ (1986) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากช่อดอกตัวผู้ของข้าวโพด 13 สายพันธุ์ บนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เปอร์เซนต์การเกิด

เอมบริโอเจนิกแคลลัสจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 0 ถึง 100 เปอร์เซนต์ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ลักษณะของเอมบริโอเจนิกแคลลัสเป็นชนิด compact สีขาว ซึ่งสามารถหวนกลับเป็นต้นได้โดยพัฒนาการแบบ เอมบริโอเจเนซีส เมื่อย้ายจากแคลลัสลงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.05 มก./ล. และให้แสง 16 ชม./วัน

Wang (1987) รายงานถึงการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่ (mature embryo) ของสายพันธุ์ A632, B73 และ Mo17 บนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1-2 มก./ล. พบว่าเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสจะอยู่ในช่วง 23-100 เปอร์เซนต์ โดยที่สายพันธุ์ Mo17 ให้ผลดีที่สุด 2,4-D จะเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่ได้ดีกว่า NAA และ IAA เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ที่ไม่เสริมฮอร์โมน และ ให้แสง 16 ชม./วัน เฉพาะสายพันธุ์ B73 และ Mo17 เท่านั้น ที่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ประมาณ 4-15 เปอร์เซนต์ การพัฒนาไปเป็นต้นผ่านกระบวนการเอมบริโอเจเนซีส

Fransz และ Schel (1990) ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอมบริโอ-เจนิกแคลลัสชนิด compact และ friable พบว่า แคลลัสชนิด compact จะพบบริเวณของเนื้อเยื่อเจริญ และบริเวณที่มีเซลล์ประกอบด้วย vacuole ขนาดใหญ่ ที่สำคัญคือจะพบระบบท่อลำเลียงกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อของแคลลัส ขณะที่แคลลัสชนิด friable จะไม่พบระบบของท่อลำเลียงเลย เซลล์จะมีลักษณะของการพัฒนาน้อยกว่าและกลุ่มของเซลล์จะเกาะตัวกันหลวมกว่า อย่างไรก็ตามแคลลัสทั้ง 2 ชนิด สามารถพัฒนาให้เกิด somatic embryo ได้จาก meristematic cell ซึ่งจะมี nucleus ขนาดใหญ่ และ cytoplasm เข้มข้น

Reddy และ Petolino (1990) ศึกษาการเกิด somatic embryogenesis จากแคลลัสที่ชักนำจาก immature inflorescense จากการทดลองพบว่าเกิดแคลลัสขึ้น 2 ชนิด คือชนิด compact และ friable แต่แคลลัสชนิด compact เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ อาหารสูตร MS จะเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด compact มากกว่าสูตร N_6 และพบว่า L-proline สามารถเพิ่มเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้ โดยมีผลในอาหารสูตร N_6 มากกว่าสูตร MS ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมคือ 2 มก./ล. การชักนำให้เกิดต้นทำได้โดยย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่มี BAP 3.5 มก./ล. เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วจึงย้ายลงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เสริมฮอร์โมน ลักษณะของพัฒนาการเป็นแบบเอมบริโอเจเนซีส โดยมีเปอร์เซนต์การหวนกลับเป็นต้นประมาณ 50 เปอร์เซนต์

<u>การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Suspension cell culture)</u> มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพดครั้งแรกโดย Sheridan (1975) ทำการศึกษาในสายพันธุ์ A188 โดยใช้เซลล์เริ่มต้นจากแคลลัสที่เป็นชนิด compact ทำให้ลักษณะของเซลล์แขวนลอยมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-10 มม. Sheridan พยายามที่จะแยกเอากลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่แขวนลอยในอาหารออกไปเพาะเลี้ยง แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ต่อมา Green (1978) ปรับปรุงลักษณะของการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยให้มีขนาดเล็กลง จนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-50 ไมโครเมตร ในข้าวโพดสายพันธุ์ Black Mexican Sweet โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. อย่างไรก็ตาม เซลล์แขวนลอยที่ได้จากการทดลองนี้ไม่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้

เนื่องจากแคลลัสชนิด friable มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย Bartkowiak (1981) ทำการคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะ friable ได้หลังจากทำการย้ายเนื้อเยื่อชนิด compact อย่างต่อเนื่องจำนวน 18 ครั้ง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย พบว่ามีขนาดของกลุ่มเซลล์ประมาณ 20-40 ไมโครเมตร และสามารถนำไปกระจายกลับบนอาหารแข็งแล้วแบ่งตัวเป็นแคลลัสได้อีกครั้งหนึ่ง

Kamo และ Hodges (1986) สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด และทำให้หวนกลับเป็นต้นได้สำเร็จ โดยใช้เซลล์เริ่มต้นจากแคลลัสชนิด friable ที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้ อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยคือ สูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1-1.5 มก./ล., ABA 0.1 ไมโครโมลาร์, L-proline 0.69 ก./ล. และ casein hydrolysate 100 มก./ล. เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที ขนาดของเซลล์แขวนลอยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7 มม. เมื่อกระจายเซลล์แขวนลอยบนอาหารกึ่งแข็งสูตร N_6 กลุ่มเซลล์สามารถเจริญและมีการพัฒนา somatic embryo ซึ่งเมื่อย้ายลงสู่อาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมนและให้แสง 16 ชม./วัน somatic embryo สามารถพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ได้

<u>การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะมิโนสูง</u> มีรายงานว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช สามารถใช้ในการเพิ่มผลผลิตกรดอะมิโนจำเป็นให้มีระดับสูงขึ้นได้ในพืชหลายชนิด Schaeffer และ Sharp (1981) สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ผลิตไลซีนสูงกว่าปกติ โดยการเติม S-aminoethylcystein (S-AEC) ซึ่งเป็นอะนาล็อกของไลซีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณไลซีนขึ้น 3-10 เปอร์เซนต์ Ranch และคณะ (1983)

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของ Datura innoxia ที่ต้านทานต่อ 5-methyltryptophan ซึ่งเป็นอะนาล็อกของทริฟโตเฟน (tryptophan) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ anthranilate synthase ทำให้สามารถต้านทานต่อการยับยั้งแบบป้อนกลับได้ เป็นผลให้มีการสร้างทริฟโตเฟนอิสระสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ปกติ 8-30 เท่า ลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงไปจนถึงระดับยีน Gonzales และคณะ (1984) สามารถสร้างสายพันธุ์ของยาสูบเพาะเลี้ยงที่สามารถเจริญ และต้านทานต่อเอทไธโอนีนได้สูงกว่าสายพันธุ์ปกติถึง 27 เท่า สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสังเคราะห์ เมทไธโอนีน, ทรีโอนีน และไลซีน สูงขึ้น 110, 18 และ 5 เท่าของสายพันธุ์ปกติ ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ lysine sensitive aspartokinase จากเดิม 16 เท่า แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์นี้ เนื่องจากค่า Km ของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง

Boyes และ Vasil (1987) ปรับปรุงพันธุ์ Pennisetum americanum L. ให้ต้านทานต่อ S-aminoethylcystein เป็นผลให้แคลลัสมีการสร้างไลซีนอิสระสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ 5 เท่า เมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้หวนกลับเป็นต้นแล้วนำไปวิเคราะห์พบว่าใบของต้นที่ต้านทานต่อ S-aminoethylcystein มีปริมาณไลซีนสูงกว่าต้นที่ไม่ต้านทานถึง 7 เท่า และพบว่าแคลลัสที่ต้านทานต่อ S-aminoethylcystein สูงขึ้น จะมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นลดลง และจะพบต้นที่มีลักษณะผิดปกติมากขึ้น Madison และ Thompson (1988) คัดเลือกสายพันธุ์ของถั่วเหลืองโดยสร้างเนื้อเยื่อที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน พบว่าลักษณะการต้านทานต่อเอทไธโอนีนเกิดขึ้นโดยมีกลไก 2 แบบ กลไกแบบแรกจะเป็นการยับยั้งการนำเอทไธโอนีนเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะไม่ทำให้ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระในเซลล์สูงขึ้น ส่วนอีกกลไกหนึ่งได้แก่การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ให้สามารถต้านทานต่อการยับยั้งแบบป้อนกลับ ทำให้แคลลัสสามารถสังเคราะห์เมทไธโอนีนสูงกว่าปกติ 2-22 เท่า การเพิ่มขึ้นของเมทไธโอนีนไม่ได้มีผลมาจากการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ aspartokinase แต่คาดว่าเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่อยู่ในตอนท้ายของวิถีสังเคราะห์เมทไธโอนีน ได้แก่ cystathionine synthase และ cystathionine B-lyase

สำหรับในส่วนของข้าวโพดเองนั้น Hibberd และ Green (1980)ได้คัดเลือกสายพันธุ์ของข้าวโพดที่ต้านทานต่อไลซีนและทรีโอนีน โดยเติมไลซีนและทรีโอนีนปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหาร สายพันธุ์ที่ได้มีปริมาณของทรีโอนีน และเมทไธโอนีนอิสระเพิ่มเป็น 8.8 และ 3.8 เท่าตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนในสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไลซีนและทรีโอนีนเนื่องมาจากการ

เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ aspartokinase ตรงตำแหน่ง lysine-binding site ทำให้ต้านทานต่อการยับยั้งโดยไลซีน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ homoserine dehydrogenase

มีรายงานการศึกษาการต้านทานต่อเอทไธโอนีนในยีสต์ (Saccharomyces cerevisiae) โดย Mertz และ คณะ (1972) พบว่ากลไกของการต้านทานเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ methionine adenosyltransferase ทำให้เมทไธโอนีนไม่ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น S-adenosylmethionine จึงเกิดการสะสมของเมทไธโอนีนขึ้น แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในตอนต้นของวิถี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและชักนำให้หวนกลับเป็นต้น จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงข้าวโพด

2. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานต่ออะนาล็อกของเมทไธโอนีน ซึ่งสามารถผลิตเมทไธโอนีนในปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์บกติ

ขั้นตอนการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาชนิดของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพด

2. ศึกษาสภาวะและเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของข้าวโพด

3. ศึกษาสภาวะและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเซลล์ข้าวโพดเพาะเลี้ยงให้หวนกลับเป็นต้นสมบูรณ์ได้

4. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของอะนาล็อกของเมทไธโอนีนที่เหมาะสมในการคัดเลือกเนื้อเยื่อและเซลล์เพาะเลี้ยงให้ต้านทานต่ออะนาล็อกของเมทไธโอนีน

5. ศึกษาวิธีการคัดเลือกเซลล์ข้าวโพดที่ต้านทานต่ออะนาล็อกของเมทไธโอนีนจากเนื้อเยื่อและเซลล์เพาะเลี้ยง

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่ต้านทานต่ออะนาล็อกของเมทไธโอนีนหวนกลับเป็นต้น