# การใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในพืชและเป็นยีนเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชเศรษฐกิจ

# The use of a gene for production of anthocyanin pigment as a marker gene in plant transformation and as a target gene for increased value in crop plants

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1]
และ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง[1]

Chotipa Sakulsingharoj[1], Srimek Chowpongpang[2], Saengtong Pongjaroenkit[1]
and Varaporn Sangtong[1]

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290
[2]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม. 10900

## บทคัดย่อ

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชส่วนใหญ่มีการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะเข้ามาช่วยในการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับยีน ซึ่งทำให้เกิดความวิตกกังวลในเรื่องการถ่ายทอดยีนออกสู่สิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ยีนสร้างสีมาช่วยคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยได้ทำการถ่ายยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานิน ซึ่งคือยีน *pap1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม จากการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน พบว่า กลุ่มแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถรอดบนอาหารคัดเลือกได้เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นกลุ่มแคลลัสสามารถเกิดยอดสูงสุดคิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยอดพัฒนาเกิดต้นสูงสุดคิดเป็น 13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นที่ได้ 18 ต้นมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า มี 4 ต้นที่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส แสดงว่าเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* แทรกอยู่ในจีโนม

นอกจากนี้ได้ใช้ยีน *pap1* ถ่ายเข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ด้วยอะโกรแบคทีเรียม และมีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารคัดเลือก พบว่าชิ้นส่วนใบยาสูบรอดบนอาหารคัดเลือกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์สูงสุด คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนของใบยาสูบที่สามารถต้านทาน

ต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจะมีลักษณะเป็นสีเขียว และบริเวณขอบของชิ้นส่วนใบมีดายอดเกิดขึ้นสูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ในบางชิ้นส่วนมีดายอดสีแดงเกิดขึ้นสูงสุดคิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าตายอดที่เกิดตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ทั้งหมดจำนวน 53 ต้น โดยแยกเป็นต้นสีเขียวจำนวน 37 ต้น ต้นสีเขียวปนแดงจำนวน 11 ต้น และต้นที่แดงจำนวน 5 ต้น สำหรับต้นที่ผ่านการถ่ายยีนและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทั้งหมดจำนวน 26 ต้น เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นยาสูบ มีจำนวน 12 ต้นที่ให้ผลพีซีอาร์บวก คือต้นสีเขียวจำนวน 7 ต้น ต้นสีเขียวปนแดงจำนวน 2 ต้น และต้นสีแดงจำนวน 3 ต้น คิดเป็น 46.15 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยนี้พบว่า สามารถนำยีน *pap1* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินไปใช้คัดเลือกยาสูบที่ได้รับยีนแทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะได้

คำสำคัญ: ข้าว, ยาสูบ, ยีน *pap1*, แอนโทไซยานิน, ยีนเครื่องหมาย, การถ่ายยีน

**Abstract**

Antibiotic resistant genes were generally used in plant gene transfer system to select transgenic cells or tissues. There are public eoncerns about those genes in human health and environments. In this research, a gene for production of anthoeyanin pigment (*pap1*) was investigated for the use as seleetable marker gene in transformation of rice. Transformation of rice CV. Kitaake with *pap1* gene was condueted by *Agrobacterium*. The results showed 98% of hygromycin – resistant calli after 2 cycles of selection. The surviving calli were regenerated to shoots at 11% 4 -5 weeks after culture on regeneration medium. The transformed rice plants were developed at 13%. Leaf genomic DNA from the transformed plants were extracted and subjected to PCR technique using primers specific to *pap1* gene. Three out of eighteen transformed plants showed PCR products of 400 bp, indicating the presence of *pap1* gene in their plant genome.

In this study, leaf explants of tobacco cv. burley were transformed with *pap1* gene by *Agrobacterium* method. After 4 week-culture, the percentage of surviving leaf explants on selection medium containing hygromycin was 50%. The hygromycin resistant explants appeared green and all surviving explants generated shoot buds around the leaf edges. Some explants had red buds at 44.44%. After 8 week-culture, the shoot buds developed to 53 plantlets. The

transformed tobacco plants were green (like control untransformed plants) and red, which consisted of 37 green plants, 14 green plants with pink or red at leaf edges and 5 dark red plants. These transformed tobacco plants were analyzed by PCR teehnique to investigate the integration of *pap1* gene in plant genome. There were 12 plants that showed PCR positive results which consisted of 7 green plants, 2 green-red plants and 3 red plants. This research showed that the *pap1* gene ,which controls anthocyanin production, can be used as a selectable marker gene in transformation of tobacco.

**Keywords:** rice, tobacco, *pap1* gene, anthocyanin, marker gene, transformation