



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์แป้งในข้าวเพื่อเพิ่มน้ำหนักเมล็ด
และผลผลิต

Metabolic engineering of starch biosynthesis in rice for
increased seed weight and productivity

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2553

จำนวน 360,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. ช่อทิพา สกุดสิงหาโรจน์

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.ดร. วราภรณ์ แสงทอง

ผศ.ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต

รศ.ดร. นลินี รุ่งเรืองศรี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 / 3 / 2555

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2553 ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับการเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำแนะนำเป็นอย่างดี และให้ความอนุเคราะห์ใช้อะไอร์แบบคี่เรียง และ binary vector

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา และสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกข้าว

นอกจากนี้ขอขอบคุณนางสาววราณี เหมหาญ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และนางสาวพูนศรี อินตะ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2555

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	๗
สารบัญภาพ	๘
บทคัดย่อ	1
คำนำ	4
ตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	23
ผลการทดลองและวิจารณ์	43
สรุปผลการทดลอง	75
เอกสารอ้างอิง	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะความแตกต่างที่สำคัญของข้าว <i>indica japonica</i> และ <i>javanica</i>	8
2	สรุปการวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T ₁ โดยเทคนิค GUS Assay และเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>glgC-TM</i>	57
3	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-2 อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T ₁ คือ GUS+: GUS- เท่ากับ 3:1	63
4	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-2 อัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T ₁ คือ <i>glgC-TM+</i> : <i>glgC-TM-</i> เท่ากับ 3:1	63
5	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-3 อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T ₁ คือ GUS+: GUS- เท่ากับ 3:1	64
6	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-3 อัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T ₁ คือ <i>glgC-TM+</i> : <i>glgC-TM-</i> เท่ากับ 3:1	64
7	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-4 อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T ₁ คือ GUS+: GUS- เท่ากับ 3:1	65
8	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-4 อัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T ₁ คือ <i>glgC-TM+</i> : <i>glgC-TM-</i> เท่ากับ 3:1	65
9	สรุปการวิเคราะห์การถ่ายทอดฟีโนไทป์ของยีน <i>gusA</i> ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมจากรุ่น T ₀ ไป T ₁	66
10	สรุปการวิเคราะห์การถ่ายทอดจีโนไทป์ของยีน <i>glgC-TM</i> ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมจากรุ่น T ₀ ไป T ₁	66
11	การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ	69

12	การเปรียบเทียบผลผลิตของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ	70
13	การเปรียบเทียบปริมาณแป้งทั้งหมดของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ	74



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพ (ก) และ (ข) คือลักษณะของการเกิดรากในต้นข้าว	9
2	ลักษณะลำต้นและปล้องของต้นข้าว	10
3	ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว (spikelet)	11
4	โครงสร้างของเมล็ดข้าว	12
5	ลักษณะของเมล็ดข้าวพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์เมล็ดมะเขือ	13
6	ลักษณะของเมล็ดข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Sasanishiki	14
7	การเกิดปุ่มปมในพืชโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (ก) ลักษณะการเกิดปุ่มปมในเซลล์พืช (ข) ลักษณะของเชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
8	แผนที่พลาสมิด pCAMBIA1303	23
9	แผนที่พลาสมิด pCS8	24
10	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่สกัดโดยวิธี mCTAB ดัดแปลง ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	44
11	การวิเคราะห์ยีน <i>gusA</i> ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ด้วยเทคนิค PCR	44
12	การวิเคราะห์ยีน <i>hptII</i> ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ด้วยเทคนิค PCR	45
13	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวที่สกัดด้วยวิธี mCTAB ดัดแปลง ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	46
14	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังแยกขนาด ด้วยเทคนิคเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก) แยกดีเอ็นเอตามขนาดหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRV</i> ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสก่อนย้ายไปบนเมมเบรน ข) หลังย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปบนเมมเบรน Nytran SuPercharge nylon transfer membrane โดยวิธี capillary transfer method	47
15	การวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน <i>glgC</i> -TM ในจีโนมข้าวพันธุ์ Sasanishiki ด้วยเทคนิค Southern blot	48
16	ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	49

ภาพที่		หน้า
17	ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนของดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอตัวอย่างจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8	50
18	ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>glgC</i> -TM ในเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิค RT – PCR	51
19	ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>glgC</i> -TM ในเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย พลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT – PCR	52
20	การตรวจสอบโปรตีน GlgC-TM ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค SDS-PAGE	53
21	การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GlgC-TM ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blot ที่ใช้แอนติบอดี Anti-GlgC-TM	54
22	ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน <i>gusA</i> ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ n) คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับยีน ข) คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ได้รับยีน <i>gusA</i>	58
23	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-2	59
24	การวิเคราะห์ยีน <i>glgC</i> -TM ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-2	60
25	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-3	61
26	การวิเคราะห์ยีน <i>glgC</i> -TM ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-3	61
27	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-4	62
28	การวิเคราะห์ยีน <i>glgC</i> -TM ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T ₁ ต้นที่ CS8-4	62
29	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ n) ต้นข้าวปกติ ข) ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน pCambia1303 ค) ต้นข้าว CS8-2-2 ง) ต้นข้าว CS8-2-8 จ) ต้นข้าว CS8-2-16 ฉ) ต้นข้าว CS8-2-18 ช) ต้นข้าวที่ CS8-3-1 ซ) ต้นข้าว CS8-3-2 ฉ) ต้นข้าว CS8-4-13	71

30	กราฟแสดงกิจกรรมเอนไซม์ AGPase สัมพัทธ์ระหว่างต้นข้าวปกติกับต้นข้าว ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T ₂	73
----	---	----



การปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์แป้งในข้าวเพื่อเพิ่มน้ำหนักเมล็ด
และผลผลิต

Metabolic engineering of starch biosynthesis in rice for increased
seed weight and productivity

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง พงษ์เจริญกิต
และ นลินี รุ่งเรืองศรี

Chotipa Sakulsingharoj, Varaporn Sangtong, Saengtong Pongjaroenkit
and Nalineer Roongruangsree

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

เอนไซม์เอดีพีกลูโคสไพโรฟอสฟอริเลส (ADP-glucose pyrophosphorylase; AGPase) เป็นเอนไซม์หลักที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในเมล็ดข้าว ดังนั้น ถ้ากิจกรรมของเอนไซม์ AGPase เพิ่มขึ้น ก็อาจจะส่งผลให้เพิ่มแป้งและน้ำหนักเมล็ดได้ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ Sasanishiki ซึ่งได้รับการถ่ายยีน *glgC-TM* ที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ AGPase กลายพันธุ์ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูง โดยให้ยีนมีการแสดงออกอย่างจำเพาะในเมล็ดข้าว เมื่อวิเคราะห์ยีน *glgC-TM* ในข้าวโดยเทคนิค Southern blot พบว่า มียีน *glgC-TM* แทรกอยู่ในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR และ Western blot พบว่า มีการแสดงออกของยีน *glgC-TM* ในระดับ mRNA และโปรตีนในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ ยีน *glgC-TM* มีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก โดยมีอัตราส่วนการกระจายตัวของยีนเป็น 3:1 ซึ่งเป็นไปตามกฎของเมนเดล และการถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูกเป็นไปอย่างเสถียร การเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานวิทยาของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมกับต้นข้าวปกติ พบว่ามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมบางต้นมีน้ำหนักเมล็ดมากกว่าต้นข้าวปกติ และมีกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในเมล็ดข้าวสูงกว่าต้นข้าวปกติ 1.3 เท่า และมีต้นข้าวดัดแปลง

พันธุกรรมที่มีปริมาณเบี่ยงสูงกว่าต้นข้าวปกติ งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถถ่ายยีน *glgC*-TM จากแบคทีเรียเข้าสู่ข้าว และยีนมีการแสดงออกในเมล็ดข้าว ทำให้เพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในเมล็ด ส่งผลให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์แป้งในเมล็ด และเพิ่มน้ำหนักเมล็ด ดังนั้น การให้เทคนิคการปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์แป้งอาจเป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตสูงขึ้นได้ในอนาคต

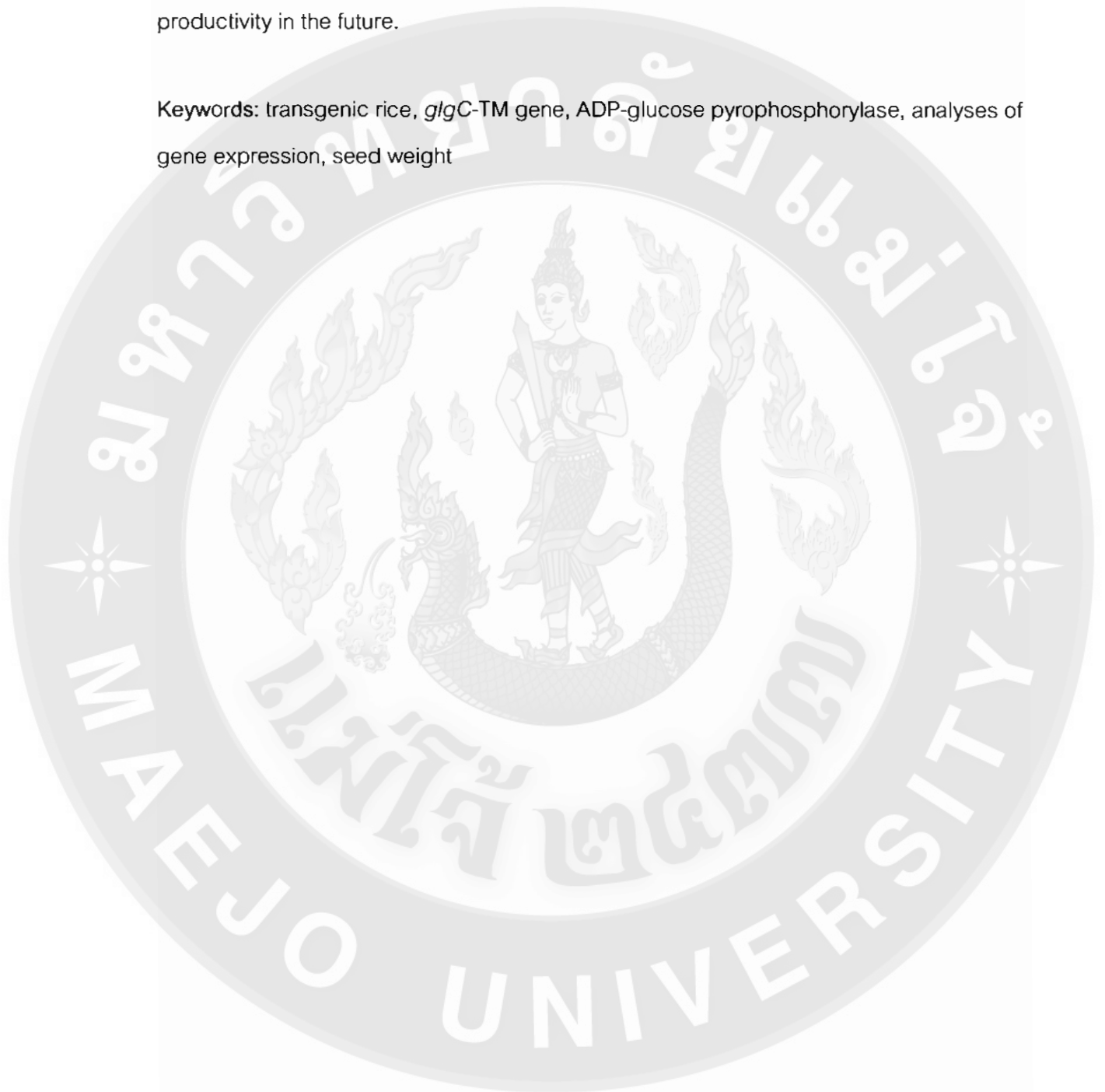
คำสำคัญ: ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ยีน *glgC*-TM เอนไซม์เอดิฟิกลูโคสไพโรฟอสฟอริเลส การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน น้ำหนักเมล็ด

Abstract

ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) controls a rate-limiting step in starch biosynthesis in rice seeds. Increasing AGPase activity may result in increased starch biosynthesis and seed weight. In this study, analyses of transgenic rice cv. Sasanishiki transformed with bacterial *glgC*-TM gene encoding mutant AGPase with high activity and specifically expressing in rice endosperm. Southern blot analysis showed that the *glgC*-TM gene was stably integrated into genome of transgenic rice plants. Analyses of these plants using RT-PCR and Western blot revealed the expression of *glgC*-TM gene at mRNA and protein levels in rice seeds. In addition, segregation analysis indicated that *glgC*-TM gene was transmitted into progeny following Mendelian fashion with the ratio of 3:1. Stable inheritance of *glgC*-TM gene was also found in subsequent generations. Comparison on phenotypes of transgenic and untransformed plants showed no significant difference among them. However, some transgenic plants had higher seed weight than untransformed plants. Some plants also had higher AGPase activity than wild-type plants upto 1.3 fold. Furthermore, some plants showed higher total starch content than control plants. Overall, the results from this study demonstrated that bacterial *glgC*-TM gene could be transformed and expressed into

rice. Expression of this gene resulted in an increase in AGPase activity, total starch content and seed weight. Thus, metabolic engineering of starch biosynthesis may be one of the important techniques to be used in rice improvement for increased productivity in the future.

Keywords: transgenic rice, *glgC*-TM gene, ADP-glucose pyrophosphorylase, analyses of gene expression, seed weight



คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่เป็นอาหารหลักของประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกหรือประมาณ 3,000 ล้านคน ซึ่งคนส่วนใหญ่ที่อยู่ในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารประจำวัน (สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, 2543) สำหรับประเทศไทย นอกจากจะบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักภายในประเทศแล้ว ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยถูกส่งเป็นสินค้าออกอันดับหนึ่งของโลกมากกว่า 20 ปี ตั้งแต่ปี 2522, 2524 จนถึงปัจจุบัน โดยปี 2548 ส่งออกปริมาณ 8 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 93,548 ล้านบาท มีปริมาณส่วนแบ่งการตลาด 26 % (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิต และให้ได้เมล็ดที่มีคุณภาพดี จึงมีความสำคัญต่อประเทศไทยเป็นอย่างมาก

มีการคาดการณ์ว่าประชากรโลกจะเพิ่มขึ้นจากประมาณ 6,000 ล้านคน จนถึง 8,000 ล้านคน ภายในปี ค.ศ. 2020 หรือ พ.ศ. 2563 ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องเพิ่มผลผลิตของข้าวให้ได้มากขึ้นบนพื้นที่เพาะปลูกและการใช้น้ำที่มีอยู่อย่างจำกัด ผลผลิตของข้าวเกือบจะคงที่ในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมา ทั้งๆ ที่มีการปรับปรุงพันธุ์และการใช้เทคโนโลยีต่างๆ เข้าช่วย ดังนั้น เทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคพันธุวิศวกรรมอาจจะเป็นวิธีที่ช่วยปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตและให้มีลักษณะที่ทนต่อโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นได้ (Datta, 2004)

เอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) เป็นเอนไซม์หลัก (key enzyme) ที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์แป้งในเมล็ดข้าว กิจกรรมของเอนไซม์ (AGPase activity) ในเมล็ดข้าวถูกควบคุมแบบ allosteric regulation ซึ่งถูกกระตุ้นโดย 3-phosphoglyceric acid (3-PGA) และถูกยับยั้งโดย inorganic phosphate (Pi) สภาวะภายในเมล็ดข้าวมีอัตราส่วนของ 3-PGA/Pi ต่ำ ดังนั้น AGPase activity ในเมล็ดข้าวจึงต่ำกว่าความสามารถสูงสุดของเอนไซม์ที่จะมีได้ในการสังเคราะห์แป้ง การเพิ่มการสังเคราะห์แป้งในเมล็ดข้าว อาจทำได้โดยการใส่เอนไซม์ AGPase ที่มี activity สูง โดยไม่ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง เพื่อเพิ่ม AGPase activity ในเมล็ดข้าวเพิ่มการสังเคราะห์แป้ง และนำหนักเมล็ด (Sikka *et al.*, 2001)

ยีน *g/gC-TM* (triple mutant) ได้มาจากแบคทีเรียและมีการรวมบริเวณกลายพันธุ์ 3 บริเวณ ทำให้ได้ยีนที่สร้างเอนไซม์ AGPase ที่มี activity สูงในสภาวะที่ไม่มี 3-PGA และไม่ถูกยับยั้งโดย Pi (Okita *et al.*, 2001) การถ่ายยีน *g/gC-TM* เข้าไปในข้าวอาจช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แป้ง และนำหนักเมล็ดได้

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อที่จะถ่ายยีน *glgC*-TM ซึ่งสร้าง AGPase ที่มี activity สูง เข้าไปในข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated transformation) โดยให้ยีน *glgC*-TM อยู่ภายใต้การควบคุมของ *glutelin1* (*Gt1*) promoter ซึ่งจะทำให้มีการแสดงออกของ ยีนอย่างจำเพาะในเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าว เพื่อเพิ่มการสังเคราะห์แป้งในเมล็ด และทำให้มีน้ำหนักเมล็ดสูงขึ้น



ตรวจเอกสาร

ความสำคัญของข้าว

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก ประชากรกว่าครึ่งหนึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ข้าวจึงจัดเป็นสินค้าที่มีผลกระทบต่อความมั่นคงของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความมั่นคงด้านอาหาร และในหลายประเทศถึงว่าการปลูกข้าวเป็นวัฒนธรรมประจำชาติอย่างหนึ่งของประเทศ พื้นที่การเกษตรครึ่งหนึ่งจะใช้ทำนา และกว่าร้อยละ 60 ของครัวเรือนเกษตรกร หรือประมาณ 3.7 ล้านครัวเรือน ปลูกข้าวไว้เพื่อบริโภคและหรือเพื่อการค้า ในแต่ละปีประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกข้าวและผลิตภัณฑ์เกือบแสนล้านบาท และส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกมาอย่างต่อเนื่องกว่า 20 ปี โดยในปัจจุบันมีสัดส่วนการตลาดประมาณเกือบร้อยละ 30 จึงนับว่าข้าวเป็นสินค้าที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและสังคมของประเทศเป็นอย่างมาก (พิเชียร, 2546)

ลักษณะของข้าวที่สำคัญทางการเกษตร

ลักษณะของข้าวที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร เป็นลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตสูงของต้นข้าวในท้องที่ที่ปลูก การทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงเสมอ ๆ ตลอดจนคุณภาพของเมล็ดข้าว ฉะนั้นพันธุ์ข้าวที่ดีจะต้องมีลักษณะเหล่านี้ซึ่งเป็นที่ต้องการของชาวนาและตลาด ลักษณะที่สำคัญๆ มีดังนี้

1. ระยะพักตัวของเมล็ด (seed dormancy)
2. ความไวต่อช่วงแสง (sensitivity to photoperiod)
3. ความสามารถในการขึ้นน้ำและการทนน้ำลึก (floating ability and tolerance to deep water)
4. คุณภาพของเมล็ด (grain quality)

คุณภาพของเมล็ดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ คุณภาพเมล็ดทางกายภาพ หมายถึง ลักษณะรูปร่างและขนาดของเมล็ดที่มองเห็นได้ และคุณภาพเมล็ดทางเคมี หมายถึง องค์ประกอบทางเคมีที่รวมกันเป็นเม็ดแบ่งของข้าวที่หุงต้มเพื่อบริโภค

5. ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าว (resistance to diseases and insects)
6. ลักษณะรูปต้น (plant type)

พันธุ์ข้าวที่ให้ผลิตผลสูงจะต้องมีลักษณะรูปต้นที่สำคัญ ดังนี้

- ใบมีสีเขียวแก่ ตรง ไม่โค้งงอ แผ่นใบไม่กว้างและไม่ยาวจนเกินไป
- ความสูงของต้นประมาณ 100 - 130 เซนติเมตร ความสูงของต้นเป็นระยะตั้งแต่พื้นดินถึงปลายของรวงที่สูงที่สุด
- ลำต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย
- แดกกอมากและให้รวงมาก

ชีววิทยาของข้าว

การจัดจำแนก

ข้าวจัดเป็นพืชตระกูลหญ้า อยู่ในวงศ์ *Gramineae* และอยู่ในจีนัส *Oryza* ซึ่งในจีนัส *Oryza* นี้มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 23 สปีชีส์ เป็นข้าวพันธุ์ป่า (wild rice) 21 สปีชีส์ และข้าวพันธุ์ปลูก (cultivated rice) 2 สปีชีส์ คือ *O. sativa* L. (common rice) กับ *O. glaberrima* Steud. *O. sativa* เป็นข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก เป็นข้าวที่มีการปลูกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ข้าวสปีชีส์นี้เป็นที่เชื่อกันว่ามีแหล่งกำเนิดแถบทางใต้ของทวีปเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแถบประเทศจีน ซึ่งคาดว่ามีการปลูกข้าวสปีชีส์นี้ในพื้นที่ดังกล่าวมากกว่า 10,000 ปีมาแล้ว (Chang et al., 1964) ข้าว *O. sativa* พบว่ามีการแพร่กระจายจากอินเดียเข้าสู่อียิปต์ ทวีปยุโรป อเมริกา และออสเตรเลีย และมีการแพร่กระจายจากจีนเข้าสู่เกาหลี และญี่ปุ่น

O. glaberrima เป็นข้าวที่ไม่ค่อยมีความสำคัญมากนัก มีการปลูกเฉพาะในเขตร้อนทางตะวันออกเฉียงใต้ของแอฟริกา และเชื่อว่าบางทีอาจจะมีการนำเข้ามาจากแถบพื้นที่ดังกล่าวตั้งแต่ 1500 ปีก่อนคริสต์ศตวรรษ นักพฤกษศาสตร์หลายท่านเชื่อว่า *O. perennis* เป็นบรรพบุรุษของ *O. sativa* และ *O. glaberrima* (Chang, 1964; Adair and Jodon, 1966)

ข้าวพวก *O. sativa* แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ (subspecies) คือ *indica japonica* และ *javanica* (Mc Donald et al., 1977) (ตาราง 1)

ข้าวพวก *indica* เป็นข้าวที่มีเมล็ดยาวเรียว ขนาดของเมล็ดยาวประมาณ 10.5 - 11 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 2.8 มิลลิเมตร และหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกอยู่ในเขตร้อน โดยปลูกกันมากในประเทศไทย อินเดีย พม่า เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์

ข้าวพวก *japonica* เป็นข้าวที่มีลักษณะของเมล็ดป้อมสั้น ขนาดของเมล็ดยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร กว้าง 3.5 มิลลิเมตร ข้าวสายพันธุ์นี้เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น

ข้าวพวก *javanica* เป็นข้าวที่พบปลูกในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น เป็นข้าวที่ไม่มี ความสำคัญทางเศรษฐกิจ และโดยทั่ว ๆ ไปมีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง *indica* และ *japonica*

สำหรับข้าวที่ปลูกในไทยเป็นพันธุ์ข้าวเมล็ดยาว คือ *indica* แต่ประกอบด้วยหลายพันธุ์ทั้ง ที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ และข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งมีอยู่ประมาณ 3,500 พันธุ์ ซึ่งมีข้าวป่า ข้าวพื้นเมือง และข้าวที่ผสมโดยมนุษย์ขึ้นมาใหม่ แต่ข้าวพันธุ์ที่สร้างชื่อเสียงให้กับไทยมากที่สุด คือ ข้าวหอมมะลิ

ตาราง 1 ลักษณะความแตกต่างที่สำคัญของข้าว *indica japonica* และ *javanica*

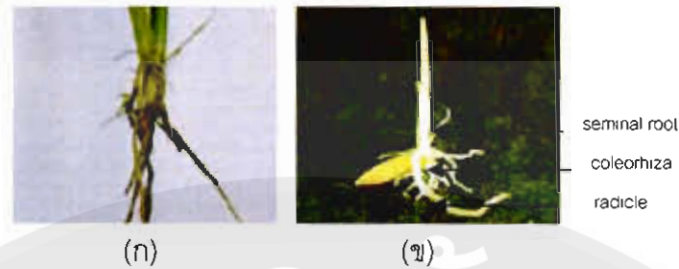
ลักษณะ	<i>indica</i>	<i>japonica</i>	<i>javanica</i>
ใบ	กว้าง สีเขียวอ่อน	แคบ สีเขียวแก่	กว้าง แข็ง สีเขียวอ่อน
เมล็ด	ยาว ค่อนข้างแบน	สั้น กลม	กว้าง หนา
การแตกกอ	แตกกอมาก	แตกกอปานกลาง	แตกกอน้อย
ต้น	สูง อ่อน	เตี้ย แข็ง	สูง แข็ง
หางของเมล็ด	สั้นมาก	สั้นมาก – ยาว	สั้นมาก – ยาว
ขนของเปลือก	สั้น	ขนมากและยาว	ขนยาว
การร่วง	เมล็ดร่วงง่าย	เมล็ดร่วงยาก	เมล็ดร่วงยาก

ที่มา: Mc Donald et al., 1979

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

1. ระบบราก (root system)

ข้าวมีระบบรากแบบ fibrous root system เมื่อนำเมล็ดข้าวมาเพาะ radicle ของข้าวก็จะแทงผ่าน coleorhiza แล้วเจริญเป็นรากอ่อนเริ่มต้นและรากอ่อนเริ่มต้นจะแตกแขนงให้ เป็นรากฝอยและต่อมาจะมี seminal root สั้นแตกออกมาจากบริเวณใบเลี้ยงและหลังจากที่ต้นอ่อนเจริญ จะเกิดรากชุดใหม่ที่บริเวณข้อใต้ดินซึ่งเรียกว่า adventitious root (ภาพ 1)



ภาพ 1 ภาพ (ก) และ (ข) คือลักษณะของการเกิดรากในต้นข้าว
ที่มา: ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต (2547)

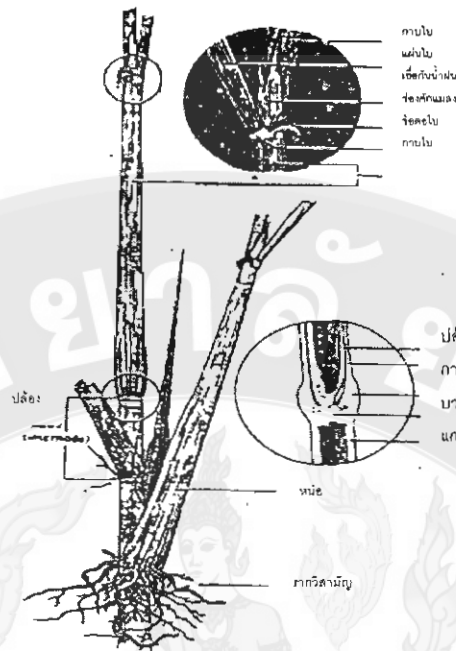
2. ใบ (leaves)

ใบของข้าวเกิดที่บริเวณข้อของลำต้น โดยเกิดขึ้นข้อละใบต้นหลักจะมีจำนวนใบมากที่สุด จากนั้นก็รองลงไปตามลำดับ คือหน่อชุดแรก หน่อชุดที่สอง และหน่อชุดที่สาม ใบของข้าวประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 4 ส่วน (ภาพ 2) คือ

- กาบใบ (leaf sheath) เป็นส่วนที่อยู่ล่างสุดของใบ เจริญออกมาจากข้อ ทำหน้าที่หุ้มตาและข้อของลำต้น
- แผ่นใบ (leaf blade) เป็นส่วนที่ขยายออกไปของใบต่อกากาบใบ ลักษณะเรียวยาว ขนาดของใบจะกว้างหรือแคบขึ้นอยู่กับพันธุ์ ใบของข้าวจะมีขนและเส้นกลางจะเห็นได้ชัดใบของข้าวที่อยู่สูงที่สุดถัดรองข้าวลงมาเรียกว่า ใบธง (flag leaf)
- เยื่อกันน้ำ (ligule) จะอยู่ที่รอยต่อระหว่างแผ่นใบและกาบใบมีลักษณะเป็นเยื่อบาง เติญว
- ใบ (auricle) เกิดที่ส่วนฐานของแผ่นใบ มีลักษณะเป็นเส้นหรือฟันเลื่อย

3. ลำต้น (stem)

ลำต้นของข้าวเรียกว่า culm ซึ่งประกอบด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าวปกติมีประมาณ 25 - 30 ปล้อง ปล้องที่อยู่บริเวณโคนจะใหญ่กว่าและสั้นกว่าปล้องที่อยู่ส่วนปลาย ปล้องของข้าวจะมีรูปร่างเป็นทรงกระบอกข้างในกลวงและจะตันเฉพาะบริเวณข้อเท่านั้น บริเวณข้อของข้าวจะพองออกมาซึ่งเรียกว่า pulvinus (ภาพ 2)

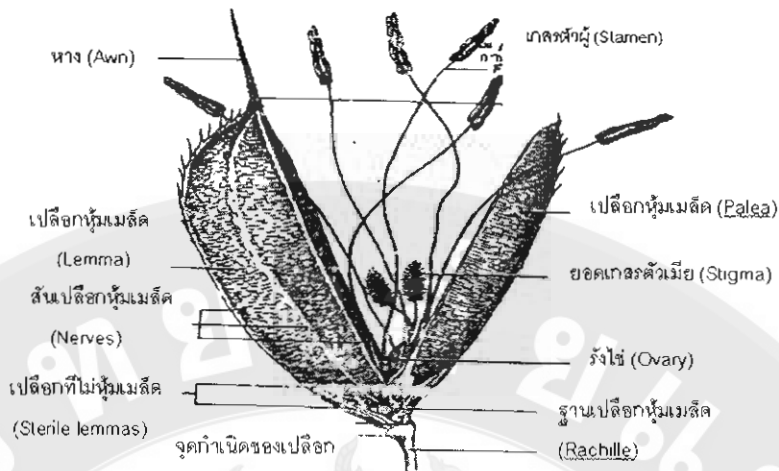


ภาพ 2 ลักษณะลำต้นและปล้องของต้นข้าว

ที่มา: ดัดแปลงจาก Datta และคณะ (1981)

4. ดอกข้าว (floral organ)

ดอกข้าวมีลักษณะของดอกเป็นช่อ (inflorescence) ซึ่งจะโผล่ออกมาจากปล้องที่อยู่บนสุดของต้นข้าว (uppermost internode) ดอกข้าวประกอบด้วยฐานของช่อดอก (panicle base) ซึ่งเป็นข้อสุดท้ายที่อยู่ต่อระหว่างปล้องบนสุดกับแกนกลางของช่อดอก ซึ่งข้อนี้เป็นข้อที่ไม่มีใบและตา แต่จะเป็นที่เกิดของแกนกลางของช่อดอก ซึ่งแกนกลางของช่อดอกเรียกว่า rachis จากแกนกลางของช่อดอกจะแตกเป็น primary branch และจาก primary branch จะแตกเป็น secondary branch (ภาพ 3)



ภาพ 3 ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว (spikelet)
ที่มา: ดัดแปลงจาก Datta และคณะ (1981)

5. เมล็ด (grain)

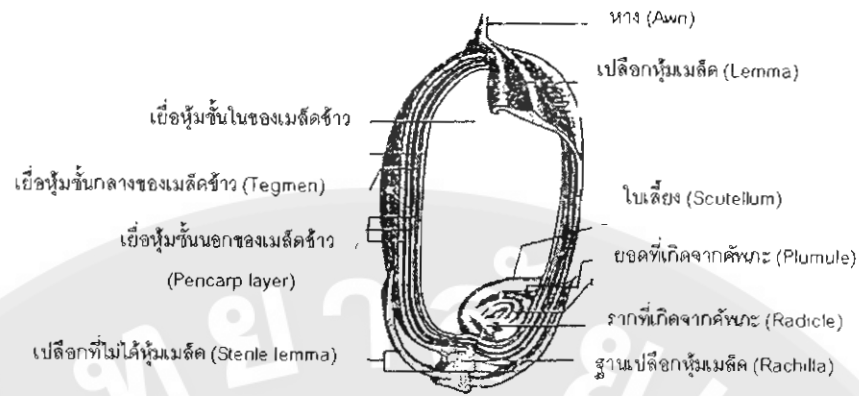
เมล็ดข้าวเป็นรังไข่ที่สุกแก่แล้วประกอบด้วยส่วนที่สะสมอาหาร (endosperm) และคัพภะ (embryo) ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกข้าว (hull) ซึ่งก็คือส่วนที่เป็น lemma กับ palea นั่นเอง อาหารสะสมเป็นส่วนแบ่งที่เราใช้บริโภค ส่วนคัพภะนั้นเป็นส่วนที่มีชีวิต และสามารถงอกออกมาเป็นต้นข้าวเมื่อนำเมล็ดข้าวไปเพาะ (ภาพ 4)

การสร้างเมล็ดของข้าว (rice grain formation) เกิดขึ้นหลังจากการผสมเกสร (pollination) และการผสมพันธุ์ (fertilization) การสร้างเมล็ดเป็นกระบวนการที่ต่อเนื่อง เมล็ดจะเปลี่ยนแปลงไปเรื่อย ๆ จนถึงสุกแก่เต็มที่ซึ่งกินเวลาประมาณ 30 วันซึ่งการสร้างเมล็ดแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ

5.1. ระย่นำนม (milk stage) หลังการผสมพันธุ์ระยะแรกๆ ส่วนที่เป็นข้าวกล้งมีลักษณะเป็นน้ำเหนียว ๆ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นนํ้านม ซึ่งเป็นเวลาประมาณ 7 วัน หลังผสมเกสร

5.2. ระยะเวลาแบ่ง (dough stage) เป็นระยะที่นํ้านมค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นแป้งอ่อน (soft dough) และกลายเป็นแป้งแข็ง (hard dough) ตามลำดับ ระยะเวลาอยู่ระหว่าง 14 – 21 วัน หลังผสมเกสร

5.3. ระยะเวลาสุกแก่ (maturation stage) ประมาณ 30 วัน หลังผสมเกสรเมล็ดจะสุกแก่เมื่อได้มีวิวัฒนาการเต็มที่ในเรื่องของขนาด (size) ความแข็ง ความใส และปราศจากสีเขียวแล้ว



ภาพ 4 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา: ดัดแปลงจาก Datta และคณะ (1981)

ชนิดของข้าว

1. แบ่งตามสภาพพื้นที่ปลูกเป็นข้าวไร่ ข้าวนาสวนและข้าวนาเมืองหรือข้าวขึ้นน้ำ
 - 1.1. ข้าวไร่ หมายถึง ข้าวที่ปลูกบนที่ดอน ไม่มีน้ำขังในพื้นที่ปลูก
 - 1.2. ข้าวนาสวน หมายถึง ข้าวที่ปลูกแบบปักดำหรือหว่าน และระดับน้ำในนาลึกไม่เกิน 80 เซนติเมตร
 - 1.3. ข้าวนาเมืองหรือข้าวขึ้นน้ำ หมายถึง ข้าวที่ปลูกแบบหว่าน และระดับน้ำในนาลึกมากกว่า 80 เซนติเมตรขึ้นไป
2. แบ่งตามชนิดของแป้งในเมล็ดที่บริโภค เป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ข้าวเจ้า และข้าวเหนียวมีต้นและลักษณะอย่างอื่นเหมือนกันทุกอย่าง แต่แตกต่างกันที่
 - 2.1. เมล็ดข้าวเจ้า ประกอบด้วยแป้งอะไมโลส (amylose) ประมาณร้อยละ 15 - 30
 - 2.2. เมล็ดข้าวเหนียว ประกอบด้วยแป้งอะมิโลเพกทิน (amylopectin) เป็นส่วนใหญ่ และมีอะไมโลสเป็นส่วนน้อย ประมาณร้อยละ 5 - 7 แป้งอะมิโลเพกทินทำให้เมล็ดข้าวมีความเหนียว เมื่อหุงต้มสุกแล้ว

ประโยชน์ของข้าว

ข้าวซึ่งแบ่งออกเป็นข้าวเหนียวและข้าวเจ้านั้น นอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารหลักประจำวันของประชาชนแล้ว ยังใช้ทำเป็นอาหาร รสหวานชนิดต่าง ๆ ทำเป็นแป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้าและทำเส้นก๋วยเตี๋ยวอีกด้วย โดยเฉพาะข้าวเหนียวใช้ทำเป็นของหวานมากกว่าข้าวเจ้า ใน

โรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตแอลกอฮอล์ก็ได้เอาข้าวเหนียวไปหุงแล้วผสมกับน้ำตาลและเชื้อยีสต์เพื่อให้เกิดการหมัก (fermentation) โดยมีจุดประสงค์ให้ยีสต์เปลี่ยนแปลงเป็นแอลกอฮอล์สำหรับใช้ผลิตวิสกี้และอื่น ๆ นี่คือประโยชน์ของข้าวที่ใช้ในประเทศไทย และส่งเป็นสินค้าออกไปขายต่างประเทศ

ข้าวพันธุ์เมล็ดมะเขือ

ชื่อพันธุ์ เมล็ดมะเขือ หรือหน่วยเขือ (ภาพ 5)

ชนิด ข้าวเจ้า
เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง มี 3 ชนิด เมล็ดสีทอง สีขาว และสีแดง

ลักษณะประจำพันธุ์

เมล็ดสั้นกลมคล้ายข้าวญี่ปุ่น ต้นข้าวมีความสูง 30-35 ซม. ให้ผลผลิตต่ำ มีผลผลิตต่อไร่ต่ำกว่า 200 กิโลกรัม ระหว่าง 10-20 ต้น/ไร่

วิธีการปลูก ข้าวเมล็ดพันธุ์มะเขือ เป็นข้าวเบา อายุ 90 วัน ไม่ชอบน้ำมาก การเพาะปลูกสามารถทำได้โดยการดำนา และข้าวไร่ หรือปลูกในบริเวณที่มีน้ำเพาะปลูกสมบูรณ์

ต้านทานต่อโรค เชื้อรา โรคไวรัส จะมีโรคอยู่บ้าง เช่น โรคใบไหม้ และแมลงรบกวน (ผู้จัดการรายวัน, 2551)

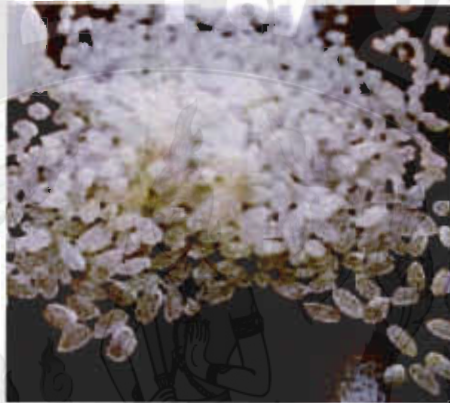


ภาพ 5 ลักษณะของเมล็ดข้าวพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์เมล็ดมะเขือ

ที่มา: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.), 2553: ออนไลน์

ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

ข้าว Sasanishiki เป็นพันธุ์ข้าวที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ Koshihikari กับ Sasashigure (ภาพ 6) การให้ผลผลิต อายุ 90-92 วัน ให้ผลผลิต 668 กก./ไร่ (จันทนา และคณะ 2539: ออนไลน์) และพบมากที่สุดในเขตฟรุคาวา จังหวัดมียางิ ข้าวชนิดนี้เป็นที่นิยมนำมาทำซูชิกันมากเพราะตัวเมล็ดข้าวมีความเหนียวนุ่ม เกาะตัวกันได้เป็นอย่างดี



ภาพ 6 ลักษณะของเมล็ดข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Sasanishiki
ที่มา: จันทนา และคณะ, 2539: ออนไลน์

การถ่ายยีนในพืช

การถ่ายยีนในพืช (Plant gene transfer) เป็นการถ่ายสารพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ และสารพันธุกรรมแทรกเข้าสู่จีโนมพืชได้และเกิดการแสดงออกของลักษณะพันธุกรรม และถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมนั้นต่อไปยังรุ่นลูกได้ (พิสสุวรรณ, 2550)

วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ประการแรก ได้แก่ ความต้องการนำยีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์เข้าสู่โครโมโซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพืชที่มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค ทั้งพืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ ประการที่สองเพื่อการศึกษาให้เกิดความเข้าใจในกลไก หรือการทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนการต่าง ๆ ในทางชีววิทยา (biological processes) เมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชและยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืช ก็จะสามารถอธิบายหรือแสดงถึงบทบาทของยีน

ยีนเดี่ยว (a single gene) หรือ ยีนกลุ่มเล็ก ๆ (a small cluster of genes) ที่นำมาใช้ถ่ายเข้าสู่พืช เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่ ยีนควบคุมแมลงศัตรูพืช ยีนต้านทานไวรัสพืช ยีนต้านทานสาร

กำจัดวัชพืช ยีนควบคุมการสุกของผลไม้ ยีนเปลี่ยนสีกลีบดอกไม้ ยีนควบคุมคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดพืชและยีนควบคุมการผสมตัวเอง ส่วนพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ที่มีรายงานการถ่ายยีนแล้ว และยีนดังกล่าวทำงานได้เมื่อเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืช ได้แก่ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ผักกาดหอม แคนโนลา ฝ้าย ถั่วเหลือง ข้าวโพด และข้าว

ปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

1. เนื้อเยื่อเป้าหมาย การคัดเลือกเนื้อเยื่อที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ในอัตราที่สูงเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน
2. การเลือกใช้ชิ้นยีน จะเลือกใช้บริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีน (selectable marker gene) และยีนรายงานผลของการถ่ายยีน (reporter gene) ที่มีประสิทธิภาพสูงและเหมาะสมกับชนิดหรือเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาถ่ายยีน
3. ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การจัดระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การคัดเลือก และการพัฒนาเป็นต้นของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่นำมาถ่ายยีนให้ใช้ระยะเวลาสั้น เพื่อลดการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Methods of plant transformation)

ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้มี 3 วิธี (วิทย์, 2538) คือ

1. การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium – mediated gene transfer)
2. การใช้เครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment)
3. การใช้เครื่อง Electroporator (Electroporation)

ทั้ง 3 วิธีนี้เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมในเซลล์พืช จากนั้นจึงจะเพาะเลี้ยงชักนำและพัฒนาเซลล์พืชที่มียีนเพิ่มเข้ามาในโครโมโซมเดิม ให้เจริญเป็นต้นพืชต้นใหม่ ซึ่งจะทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนไป

พลาสมิดพาหะ (plant vector) ที่ใช้ในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียจะประกอบด้วยชุดโครงสร้างของ target gene, screenable marker และ/หรือ selectable marker และชุดโครงสร้างของ T-DNA ส่วน plant vector ที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยวิธี electroporation และ particle bombardment ไม่จำเป็นต้องมีชุดโครงสร้าง T-DNA

เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่นำมาถ่ายยีน (Explants)

ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชสำหรับการถ่ายยีน จำเป็นต้องมีการทดสอบทดลองเพาะเลี้ยง ส่วนต่าง ๆ หรือเซลล์ต่าง ๆ ของพืชที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นพืชที่ติดดอกออกผลได้ดี โดยมีข้อควรคำนึงในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชได้แก่

1. สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่อง
2. มีอัตราการเจริญ และพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในเวลาไม่นานนัก

เนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ ใบเลี้ยงคู่แรกของต้นกล้าพืช ต้นอ่อนของพืช รากพืช คัพพะ ใบจริงของพืช ละอองเกสร โปรโตพลาสต์ แคลลัสและเซลล์แขวนลอย สำหรับพืชใบเลี้ยงคู่ใช้เนื้อเยื่อพืชได้หลายชนิดดังกล่าวแล้ว แต่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวนิยมใช้คัพพะ โปรโตพลาสต์ แคลลัสและเซลล์แขวนลอย

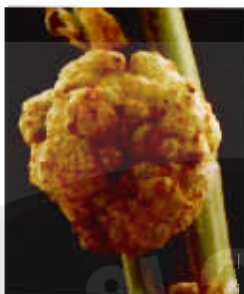
วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

วิธีการถ่ายยีนโดยใช้พาหะเป็นตัวกลางในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช เกิดการเชื่อมต่อสารพันธุกรรมที่ทำการส่งถ่ายกับจีโนมของพืช โดยใช้แบคทีเรียชื่อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ (สุรินทร์, 2539) (ภาพที่ 7ข)

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียในดินที่บุกรุกทำลายพืชทางบาดแผล ทำให้เกิดโรคปุ่มปม (crown gall) บริเวณลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด ภายในเซลล์ของแบคทีเรียมีดีเอ็นเอพิเศษมีลักษณะเป็นวงแหวนขนาดเล็กอยู่ในไซโทพลาสซึมเรียกว่า พลาสมิด Ti (Tumor inducing plasmid) ซึ่ง พลาสมิด Ti มีส่วนของดีเอ็นเอเรียกว่า T-DNA (transfer DNA) ซึ่งมียีนที่ก่อให้เกิดปุ่มปมในเซลล์พืช (ภาพ 7ก) ประกอบด้วย

- ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน ทำให้พืชมีการแบ่งเซลล์เกิดเป็นเนื้องอกปุ่มปม
- ยีนสร้างสารประกอบพวกอปิโน (opine) ซึ่งอะโกรแบคทีเรียมนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน

เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสามารถให้ส่วนของ T-DNA บน Ti plasmid เข้าสู่พืชได้ โดยเชื้อบุกรุกบริเวณบาดแผลแล้วให้ส่วน T-DNA จาก Ti plasmid ไปต่อกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมของพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติเนื่องจากผลของฮอร์โมน และพืชสร้างสารประกอบ อปิโนให้อะโกรแบคทีเรียใช้เป็นอาหารได้



(ก)



(ข)

ภาพ 7 การเกิดปุ่มปมในพืชโดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

(ก) ลักษณะการเกิดปุ่มปมในเซลล์พืช

(ข) ลักษณะของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

ที่มา: โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, 2544: ระบบออนไลน์

วิธีการถ่ายยีนด้วยการใช้เครื่องยิงอนุภาค

วิธีนี้ใช้อุปกรณ์ที่มีแรงดันในการขับเคลื่อนอนุภาคโลหะที่เคลือบผิวภายนอกด้วยดีเอ็นเอที่ถ่ายเข้าสู่พืชให้เข้าไปในเซลล์พืช แต่กระบวนการภายในเซลล์เพื่อโยกย้ายดีเอ็นเอเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืชนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด วิธีการใช้ขับเคลื่อนอนุภาคมีชื่อเรียกต่างกันตามกลไกในการขับเคลื่อน ได้แก่ วิธี microprojectile และอีกแบบหนึ่ง เรียกว่า transfer impulse หรือ biolistic การถ่ายยีนจะเกิดขึ้นเมื่ออนุภาคโลหะขนาด 1-4 ไมครอน มีแรงขับเคลื่อนที่ทำให้เกิดความเร็วประมาณ 300-600 เมตร/วินาที และสามารถผ่านทะลุผนังเซลล์พืชเข้าไปได้ กลไกทั้ง 2 แบบ สามารถนำมาใช้กับเซลล์ได้หลายชนิดทั้งพืช สัตว์ สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว และยีสต์ สำหรับพืชใช้ได้กับ explant ที่อยู่ในสภาพเซลล์แขวนลอย แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คัพพะต้นอ่อน และใบเลี้ยงคู่แรกของต้นกล้า ใช้ได้กับพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วไป เช่น ฝ้าย มะละกอ ยาสูบ ถั่ว และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง

อนุภาคโลหะที่นิยมใช้ได้แก่ ทังสเทน และทอง นำมาเคลือบผิวภายนอกด้วยดีเอ็นเอซึ่งเป็นพลาสมิดสายผสมที่มียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่ สารที่ช่วยเคลือบดีเอ็นเอติดกับอนุภาคได้แก่ calcium chloride และ spermidine จากนั้นอาจผสมอนุภาคกับ ethanol หรือ สารละลายชนิดอื่นตามวิธีการเฉพาะที่ระบุไว้สำหรับอุปกรณ์แต่ละแบบ

อุปกรณ์ที่ใช้ทำให้เกิดแรงขับเคลื่อนอนุภาคมีชื่อเรียกต่างๆ ได้แก่ gunpowder device, microtargeting apparatus, pneumatic instrument, flowing helium instrument, biolistic device เป็นต้น (ลาวัลย์ และคณะ, 2543)

วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่อง Electroporator

การถ่ายยีนที่ใช้หลักการปรับออสโมติกเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ยอมรับเอาโมเลกุล DNA จากภายนอกเข้าสู่เซลล์ แต่เดิมใช้เฉพาะสาร polyethylene glycol (PEG) ช่วยในการถ่ายยีนให้กับโปรโตพลาสต์ ต่อมาพบว่าสามารถใช้เครื่องมือช่วยร่วมกับการใช้ PEG หรือใช้เครื่องมือปรับสภาพผิวของเซลล์อย่างเดียว โดยไม่ต้องใช้ PEG เทคนิคนี้จึงเรียกว่า electroporation ซึ่งสามารถถ่ายยีนให้กับเซลล์ที่ยังมีผนังเซลล์ได้ นอกเหนือจากใช้กับโปรโตพลาสต์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

Hiei และคณะ (1994) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าว *japonica* พันธุ์ Tsukinohikari Asanohikari และ Koshihikari โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียในการทดลองมีการใช้อะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้การทดลองนี้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี อีกทั้งในการทดลองสามารถผลิตข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มีลักษณะปกติและสามารถถ่ายยีนในรุ่น R_0 , R_1 และ R_2 ได้

Toki และคณะ (1997) ได้ถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Nipponbare และ Kitaake โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pIG121Hm โดยการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมบนอาหารสูตร AB ซึ่งมียาไฮโกรมายซิน และกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ละลายเซลล์ในอาหารสูตร AAM แล้วทำการปลูกถ่ายเชือนาน 2 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารสูตร N6 – AS ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนในอาหารคัดเลือกที่มีคาร์บินิซิลิน 0.5 กรัมต่อลิตร และยาปฏิชีวนะไฮโกรมายซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ภายในระยะเวลา 2 เดือน

Hiei และคณะ (2006) ได้ปรับปรุงขั้นตอนการถ่ายยีนในข้าวอินดิกาโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปการถ่ายยีนในข้าวอินดิกามีประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำมากเมื่อเทียบ

กับข้าวสาลีพันธุ์อื่น จึงได้มีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีน เช่น การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน การคัดเลือกสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรีย และการคัดเลือกวิธีการถ่ายยีน เพื่อให้การถ่ายยีนในข้าวอินดิกามีประสิทธิภาพมากขึ้น

Toki และคณะ (2006) ได้รายงานถึงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดข้าวอายุ 1 วัน เป็นเนื้อเยื่อที่ดีสำหรับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนอีกด้วย ระบบที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถสร้างต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมได้ภายในเวลา 1 เดือน ตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเมล็ดจนได้ข้าวที่เจริญเต็มที่ในสภาวะปลอดเชื้อ ระบบนี้ช่วยลดการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งมักเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลานาน และช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในระดับโมเลกุลทำได้ง่ายขึ้นอีกด้วย

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แบ่งในพืช

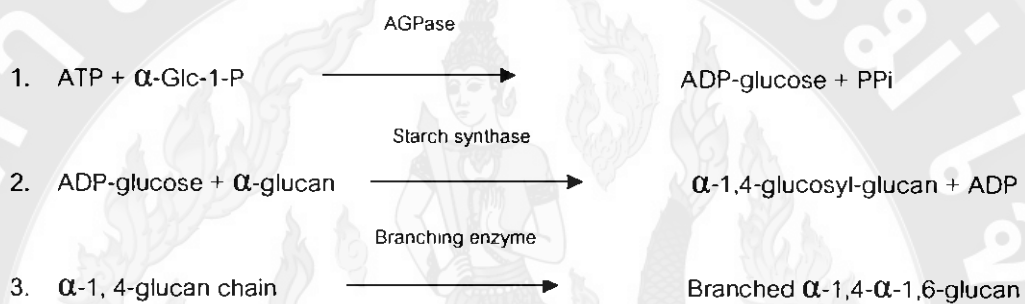
ผลผลิตของพืชขึ้นอยู่กับ source-sink relationship ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ของ source (เนื้อเยื่อที่สังเคราะห์แสงได้) และ sink (เนื้อเยื่อที่สังเคราะห์แสงไม่ได้) (Ho, 1988; Turgeon, 1989) ความสัมพันธ์นี้ประกอบด้วยความสามารถของใบสำหรับการตรึง CO_2 เพื่อผลิตน้ำตาล กรดอะมิโน และสารเมแทบอลิท์อื่นๆ ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จะถูกนำออกจากใบ และขนส่งไปยังเนื้อเยื่อ sink เช่น ใบอ่อน และราก เพื่อส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการ ซึ่งความสามารถของเนื้อเยื่อ sink ที่จะรับ CO_2 ที่ตรึงได้ในรูปของสารอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์แสง (photosynthate) และเปลี่ยนให้เป็นมวลสารชีวภาพ เช่น แป้ง ไขมัน และผนังเซลล์ เป็นต้น (Ho, 1988) เรียกว่า sink strength

ในระหว่างการเจริญเติบโต (vegetative stage) ผลผลิตของพืชถูกควบคุมโดยการสังเคราะห์แสงที่ใบ ดังนั้น งานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสนใจไปที่การเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงในใบเพื่อเพิ่มผลผลิต แต่วิธีการอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตก็คือ การเพิ่มประสิทธิภาพของ sink tissues เพื่อรับและดูดซับผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสงซึ่งสร้างจากใบ นั่นก็คือ การเพิ่ม sink strength (Okita *et al.*, 2001)

น้ำหนักเมล็ดของข้าวและธัญพืชอื่นๆ ถูกกำหนดโดยปริมาณแป้งซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 85 % ของน้ำหนักแห้ง (Juliano, 1972) ดังนั้น ถ้าทำให้การสังเคราะห์และการสะสม

แบ่งเพิ่มมากขึ้นในระยะการพัฒนากลีบเลี้ยง ก็อาจทำให้เพิ่มความสามารถของ sink (sink strength) และเพิ่มน้ำหนักกลีบเลี้ยง และท้ายที่สุดเพิ่มผลผลิตโดยรวมได้

การสังเคราะห์แป้งถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลักคือ ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสร้าง ADP-glucose และ inorganic phosphate (PPi) จาก glucose-1-phosphate (Glc-1-P) และ ATP ซึ่ง ADP-glucose นี้ จะถูกใช้โดยเอนไซม์ starch synthase และ branching enzyme สำหรับการสังเคราะห์เป็นแป้ง และสะสมในกลีบเลี้ยง ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เอนไซม์ AGPase ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในเนื้อเยื่อ sink ซึ่งไม่มีการสังเคราะห์แสง (non-photosynthetic sink organ) เช่น เมล็ด หัว และผล กิจกรรมของเอนไซม์ AGPase ในเมล็ดข้าวอ่อนถูกควบคุมแบบ allosteric regulation โดยมีตัวกระตุ้น (activator) คือ 3-phosphoglyceric acid (3-PGA) และตัวยับยั้ง (inhibitor) คือ inorganic phosphate (Pi) (Sikka *et al.*, 2001) ในเมล็ดข้าวอ่อนมี glycolysis pathway เป็นหลักสำหรับการใช้คาร์บอน ดังนั้นระดับของ 3-PGA และอัตราส่วนของ 3-PGA/Pi จึงต่ำ ภายใต้สภาวะนี้ทำให้ AGPase activity ในเมล็ดข้าว และ carbon flux ที่นำไปใช้ในการสังเคราะห์แป้งจึงต่ำกว่าความสามารถสูงสุดของเอนไซม์ที่ควรทำได้

จากการศึกษาการเจริญของข้าวภายใต้สภาวะที่มี CO_2 สูง (Chen *et al.*, 1994; Rowland-Bamford *et al.*, 1990) พบว่า ข้าวมีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักเมล็ด แสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญในการเพิ่มน้ำหนักเมล็ดและเพิ่มผลผลิตของข้าวถูกจำกัดโดย sink strength ซึ่งก็คือ ความสามารถของเมล็ดอ่อนในการรับ photosynthate และเปลี่ยนไปเป็นแป้ง นอกจากนี้มีงานวิจัยอีกจำนวนมากที่สนับสนุนว่าน้ำหนักเมล็ดถูก

ควบคุมโดย sink มากกว่า source (Baker *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1994; Imai *et al.*, 1985; Rowland-Bamford *et al.*, 1990)

ดังนั้น การเพิ่มการสังเคราะห์แป้งในเมล็ดข้าวอาจทำได้โดยใช้เอนไซม์ AGPase ที่มี activity สูง และไม่ถูกควบคุมโดย allosteric effectors คือ ไม่ขึ้นกับการกระตุ้นโดย 3-PGA และการยับยั้งโดย Pi เพื่อเพิ่ม activity ของเอนไซม์ AGPase ในเมล็ดข้าว และส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์แป้ง และมีน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น

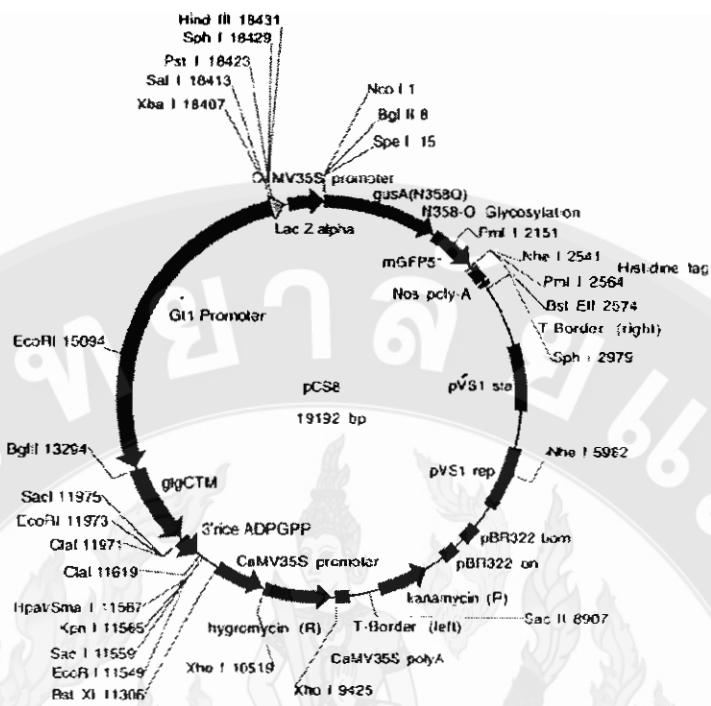
เอนไซม์ AGPase ที่มี activity สูงส่วนใหญ่พบได้ในแบคทีเรีย และเป็นเอนไซม์หลักสำหรับการสังเคราะห์ไกลโคเจนในแบคทีเรีย ซึ่งเทียบได้กับการสังเคราะห์แป้งในพืชชั้นสูง เอนไซม์ AGPase จากแบคทีเรียสร้างมาจากยีนที่มีชื่อว่า *glgC* (Leung and Preiss, 1987; Okita *et al.*, 1981) มี mutant AGPase หลายชนิดที่แยกได้จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ 618, SG5, SG14 และ CL1136 (Preiss and Romeo, 1994) ต่อมาได้มีการทำการรวมบริเวณปลายพันธุ์ (pyramiding) ของ mutant gene ในสายพันธุ์ 618, SG5 และ CL1136 เพื่อสร้างยีน *glgC* triple mutant (TM) หรือ *glgC*-TM ซึ่งสร้างเอนไซม์ AGPase ที่มี activity สูงในสถานะที่ไม่มี activator (3-PGA) และทนต่อการยับยั้งด้วย Pi (Okita *et al.*, 2001)

มีงานวิจัยที่ทำการถ่ายยีน *glgC* ที่สร้าง AGPase ที่มี activity สูงเข้าไปในพืช และพบว่าพืชมี AGPase activity สูงขึ้น และมีน้ำหนักของเมล็ดและหัวสูงขึ้น ได้แก่ การถ่ายยีน *glgC* เข้าไปในมันฝรั่ง (Stark *et al.*, 1992) ข้าวญี่ปุ่น (Sakulsingharoj *et al.*, 2004) มันสำปะหลัง (Ihemere *et al.*, 2006) และข้าวโพด (Wang *et al.*, 2007) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่ม AGPase activity ใน sink tissues สามารถทำให้มีการสังเคราะห์แป้งเพิ่มขึ้น เพิ่ม sink strength เพิ่มน้ำหนักเมล็ดและหัว และทำให้เพิ่มผลผลิตของพืชได้

เทคนิคการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียจะช่วยให้สามารถถ่ายยีน *glgC*-TM เข้าไปในข้าวไทยเพื่อเพิ่มการสังเคราะห์แป้ง และน้ำหนักเมล็ดได้ นอกจากนี้แป้งข้าวยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมแป้งได้อีกด้วย อุตสาหกรรมแปรรูปทางการเกษตรที่เป็นหลักของประเทศไทย ก็คือ อุตสาหกรรมแป้ง โดยแป้งมันสำปะหลังมีการผลิตมากที่สุด รองลงมาคือ แป้งข้าว โดยมีการส่งออกแป้งข้าวเหนียวประมาณ 1,700,000 ตันต่อปี เส้นหมี่ก๋วยเตี๋ยวประมาณ 250,000 ตันต่อปี นอกจากแป้งเป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานที่สำคัญแล้ว องค์ประกอบของแป้งที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล น้ำเชื่อม และอุตสาหกรรมหมักต่างๆ ได้อีกด้วย การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแป้ง ให้เหมาะสมสำหรับเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่แป้งได้ นอกจากนี้ ได้มีการนำแป้งมาใช้

ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น กระดาษ สิ่งทอ ยา กาว เป็นต้น อุตสาหกรรมแป้งจึงถูกจัดว่าเป็น อุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพเต็มรูปแบบ (กล้านรงค์, 2546)

ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นผู้ผลิตแป้งข้าวโพดรายใหญ่ ได้นำเทคนิคพันธุวิศวกรรม มาช่วยในการดัดแปรคุณสมบัติของแป้งในข้าวโพด เพื่อให้มีความเหมาะสมกับอุตสาหกรรมที่ แตกต่างกันไป เช่น การผลิตสารให้ความหวาน การผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ โดยทำให้แป้งมีขนาดเล็กและมีปริมาณอะไมโลสสูง (กล้านรงค์, 2546) ดังนั้น ในประเทศไทย ซึ่งมีการผลิตข้าวเป็นหลัก การเข้าใจกลไกการสังเคราะห์แป้งในเมล็ดข้าว จะทำให้สามารถเพิ่ม การผลิตแป้งและดัดแปรแป้งข้าวให้มีคุณสมบัติใหม่โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมเพื่อให้เกิดความ หลากหลายของแป้งข้าวไทยในอนาคตได้



ภาพ 9 แผนที่พลาสมิด pCS8

วิธีการดำเนินการวิจัย

แบ่งการทดลองออกเป็น 10 การทดลอง ดังนี้

1. การตรวจสอบการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS Assay
2. การวิเคราะห์ยีน *gusA* ยีน *hptII* และยีน *glgC-TM* ในข้าวด้วยเทคนิค PCR
3. การวิเคราะห์จำนวนชุดยีนที่แทรกในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค Southern blot
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยเทคนิค RT – PCR
5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนโดยเทคนิค Western blot
6. การวิเคราะห์การถ่ายยีนสู่รุ่นลูกและการกระจายตัวของยีน
7. การเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมกับต้นข้าวปกติ
8. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ AGPase
9. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดในเมล็ดข้าว
10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay

นำแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงร่วม และชิ้นส่วนใบของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน มาบ่มร่วมกับสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1–24 ชั่วโมง ชิ้นส่วนพืชที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* จะสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase แล้วเปลี่ยน X-gluc ให้ได้สารสีฟ้า หลังจากนั้น ล้างคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยให้เห็นสีฟ้าชัดเจนขึ้น

2. การวิเคราะห์ยีน *gusA* ยีน *hptII* และยีน *glgC-TM* ในข้าวด้วยเทคนิค PCR

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวโดยใช้วิธี mCTAB (ดัดแปลงจาก Hwang and Kim, 2000) นำใบข้าวจากต้นที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและมีการแสดงออกของยีน *gusA* เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว ด้วยวิธี mCTAB

- 1 ตัดใบข้าว ให้มีน้ำหนักประมาณ 300 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ และใส่ลูกปัด 3 ลูก
- 2 แช่หลอดในไนโตรเจนเหลว แล้วนำหลอดมาเขย่าโดยใช้เครื่อง vortex เพื่อบดใบข้าวจนได้ผงละเอียด
- 3 เติมสารละลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับตามสัดส่วนปริมาณใบ ถ้าเติม mCTAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะต้องเติม mercaptoethanol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex
- 4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที
- 5 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายเอาส่วนใสในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนออกมา จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลาย 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
- 6 เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB แล้วทำการ Vortex เล็กน้อย

- 7 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 8 ย้ายชั้นน้ำด้านบนใสในหลอดใหม่ (ทำซ้ำในข้อที่ 3.1.6-3.1.7 จนกระทั่งชั้นของโปรตีนเหลือน้อยที่สุด) ซึ่งการทำซ้ำที่ 2 ถ้าย้ายชั้นน้ำมาปริมาตรเท่าไร ให้เติม chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน
- 9 เติม 3 M Na-acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน
- 10 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วเติม ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน 2 ครั้ง)
- 11 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- 12 ตาก pellet ให้แห้ง แล้วละลายด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติมบัฟเฟอร์เพิ่ม)

การวิเคราะห์ยีนในข้าวด้วยเทคนิค PCR

การวิเคราะห์ยีน *glgC-TM* ในข้าวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC-TM*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC-TM* โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Go Taq	10
10 μ M F_G-TM	1
10 μ M R_G-TM	1
DNA Template	1
dH ₂ O	7
Total	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	62 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

การวิเคราะห์ยีน *gusA* ในข้าวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Go Taq	10
10 μ M F_ <i>gusA</i> -1	1
10 μ M R_ <i>gusA</i> -1	1
DNA Template	1
dH ₂ O	7
Total	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

การวิเคราะห์ยีน *hptII* ในข้าวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII* โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Go Taq	10
10 μ M F_ <i>hptII</i>	1
10 μ M R_ <i>hptII</i>	1
DNA Template	1
dH ₂ O	7
Total	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

3. การตรวจสอบการแทรกตัวของชุดยีนในจีโนมข้าวโดยเทคนิค Southern Blot โดยวิธีตามชุด kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)

การเตรียม Probe สำหรับ Southern blot โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis kit

ใช้พลาสมิด pCS8 ซึ่งมียีน *g/gC-TM* แทรกอยู่ ความเข้มข้น 10 pg เป็นแม่พิมพ์ ในการสร้าง Probe

โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR DIG Probe Synthesis kit ในการสร้าง Probe ยีน *g/gC-TM*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	DIG labeled experimental probe (ไมโครลิตร)	Unlabeled control probe (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer with $MgCl_2$	5	5
10X PCR DIG Probe Synthesis Mix	5	-
dNTP stock solution	-	5
10 μM F_G-TM	5	5
10 μM R_G-TM	5	5
Enzyme mix	0.75	0.75
10 pg Template pCS8	5	5
Water, PCR grade	24.25	24.25
Total Volume	50	50

สภาวะในการการสังเคราะห์ Probe

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 35 รอบ
Annealing	62 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1 นำใบข้าวจากต้นที่มีผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคPCR มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้วิธี mCTAB

2 นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาในการตัด คือ dH_2O , 10X buffer และจีโนมิกดีเอ็นเอ เติมลงในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดเอนไซม์ตัดจำเพาะผสมในหลอดโดยการปิเปตขึ้นลง (เอนไซม์ต้องอยู่ในที่เย็น)

3 ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อสารละลายมารวมกันข้างล่างทั้งหมด

4 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชำ้มน

การตกตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกล้างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1 เติม 1/10 ของ 3 M Sodium acetate (NaOAc), pH 5.2 ทำการขยับกรอกให้เข้ากัน แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย

2 นำไปแช่ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที

3 ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำการดีดให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด) ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ทำซ้ำในขั้นตอน 3 และ 4 อีกครั้ง)

5 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งประมาณ 30 นาที

6 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

7 แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้ 0.8% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

8 ถ่ายรูปเจลเพื่อดูการตัดของเอนไซม์ว่าสมบูรณ์หรือไม่ และดูปริมาณดีเอ็นเอก่อนนำไป Blot โดยทาบบไม้บรรทัดข้างเจล

การ blotting

1 หลังจากการถ่ายรูปเจล นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอมาแช่ในสารละลาย Denaturation และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง

2 ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ไหลผ่านเจล

3 นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอมาแช่ในสารละลาย Neutralization และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง

4 แช่เจลเป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที ใน 20X SSC

5 ตัดกระดาษกรอง แผ่นไนลอนเมมเบรน Positively charged (Roche Diagnostics GmbH, Germany) ให้พอดีกับแผ่นเจล และตัดสะพานกระดาษ

6 นำกระดาษกรอง แผ่นไนลอนเมมเบรน สะพานกระดาษ มาจุ่มใน 20X SSC ให้ชุ่ม

7 วางสะพานที่จุ่มไปด้วย 20X SSC และแช่อยู่ใน 20X SSC ก่อน ตามด้วยวางกระดาษกรองที่จุ่มด้วย 20X SSC วางเจลคว่ำลงบนกระดาษกรอง ใส่ฟองอากาศออกให้หมด ประคบด้วยเมมเบรนที่จุ่มด้วย 20X SSC ทับด้านบน ใส่ฟองอากาศ ปิดทับด้วยกระดาษกรองที่แห้งและชั้นกระดาษแล้วกดทับด้วยน้ำหนักประมาณ 200-500 กรัม เพื่อให้เกิดการย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยังเมมเบรนโดยทิ้งไว้ข้ามคืน

การ Hybridization

- 1 นำเจลไปแช่เอทธิเดียมโบรไมด์ เพื่อตรวจสอบการย้ายดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน และถ่ายรูปเจลหลัง blot
- 2 ทำให้ดีเอ็นเอติดแน่นบนแผ่นเมมเบรน โดยล้างด้วย 2X SSC แล้วนำแผ่นเมมเบรน ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3 นำแผ่นเมมเบรนมา Pre-hybridization ในสารละลาย hybridization เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และ Pre-hybridization สารละลาย hybridization ไปพร้อมกันด้วย
- 4 ใส่ prob ที่ติดฉลากด้วย DIG – prob ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
- 5 ผสม prob ที่แยกสายแล้วลงในสารละลาย hybridization ที่ผ่านการบ่มแล้ว เท Pre - hybridization ที่ทิ้ง แล้วเทสารละลาย hybridization ที่ผสม probe แล้วลงใน hybridization bottom
- 6 บ่ม blot ร่วมกับ prob ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 – 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และหมุนตลอดเวลาในเครื่อง Rotary hybridization oven

การล้างแผ่นเมมเบรน

- 1 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Low stringency ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 2 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย High stringency ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที
- 3 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Washing Buffer เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
- 4 บ่มแผ่นเมมเบรนด้วย Blocking Solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แต่ไม่เกิน 3 ชั่วโมง
- 6 บ่มแผ่นเมมเบรนด้วย Antibody Solution เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 7 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Washing Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที
- 8 แช่แผ่นเมมเบรนใน Detection Buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที
- 9 เติมน้ำ Chemiluminescent substrate (CSPD กับ Detection buffer ในอัตราส่วน 1 : 100) ใส่ให้ทั่วแผ่นเมมเบรน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ในที่มืด

10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

11 ประกบฟิล์ม X-Ray Film (Kodak) เป็นเวลา 1 – 24 ชั่วโมง ใน Kodak Medical X-Ray Cassette 8×10 inch (Kodak)

12 นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Developer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

13 นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Fixer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

14 ตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยเทคนิค RT-PCR

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนของข้าว ตามวิธี Trizol reagent

ขั้นตอน Homogenization

- 1 บดเมล็ดอ่อนข้าวให้ละเอียด โดยใช้ไนโตรเจนเหลว
- 2 ใส่ Trizol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์

ขั้นตอน Phase separation

- 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 2 เติม Chloroform ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร
- 3 พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 5 วินาที
- 4 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที
- 5 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20

นาที

ขั้นตอน RNA precipitation

- 1 ย้ายชั้นน้ำใสหลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร
- 2 เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 4 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอน RNA wash

- 1 ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้าง pellet ด้วย Ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2 Vortex อีกครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3 ทำข้อ 1 - 2 อีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอนการละลายตะกอน RNA

- 1 ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วตากให้แห้ง
- 2 เติม DEPC Water (RNase free) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
- 3 ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

การจัดตั้งเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase (DNase treatment)

เติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาการทำ DNase treatment ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอทั้งหมด	40
10X Reaction buffer with MgCl ₂	6
DEPC-treated water	8
DNaseI	6
ปริมาตรสุดท้าย	60

- 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 -- 45 นาที หรือ 1 ชั่วโมง
- 3 เติม 25 mM EDTA ปริมาตร 3 ไมโครลิตร
- 4 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 5 เก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ในตู้ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *glgC* - TM ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ oligo(dT)

นำอาร์เอ็นเอที่ทำการ DNase treatment แล้วมาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription และใช้ oligo(dT) เป็นไพรเมอร์ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Superscript III Reverse Transcriptase system (Invitrogen, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา First-Strand cDNA Synthesis ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอทั้งหมด	8
ไพรเมอร์ oligo(dT) 50 μ M	1
10 mM dNTP mix	1
DEPC-treated water	0
ปริมาตรสุดท้าย	10

1 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที
อย่างน้อย 1 นาที

2 เตรียม cDNA Synthesis Mix ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X RT buffer	2
25 mM $MgCl_2$	4
0.1 M DTT	2
RNaseOUT (40 u/ μ l)	1
SuperScript III (200 U/ μ l)	1
ปริมาตรสุดท้าย	10

3 เติมน้ำในหลอดตัวอย่าง หลอดละ 10 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ แล้วปั่นตก

4 บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที

5 บ่มที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6 นำออกมาแช่ในน้ำแข็งทันที

7 ปั่นตก เติม RNaseH 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

8 เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำ PCR

**การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนข้าว
ด้วยเทคนิค PCR**

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยเทคนิค PCR โดยการนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ F_G-TM และ R_G-TM ให้ PCR product ขนาดประมาณ 662 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของดีเอ็นเอใน Total RNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2xGo Taq	1X	10
F_G-TM	0.5 μ M	1
R_G-TM	0.5 μ M	1
RNA Template	-	8
Total	-	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	62 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

**การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC*-TM ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนข้าว
ด้วยเทคนิค RT-PCR**

นำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC*-TM ผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้รับประมาณ 662 คู่เบส โดยมีองค์ประกอบของ PCR ในการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *glgC* - TM โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC* - TM ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Go Taq	1X	10
10 μ M F-G-TM	0.5 μ M	1
10 μ M R-G-TM	0.5 μ M	1
Template cDNA	-	2
dH ₂ O	-	6
Total	-	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 นาที	} 28 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	62 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *glgC* - TM ด้วยเทคนิค semiquantitative-RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC* - TM

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *actin* ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนข้าวด้วยเทคนิค semiquantitative-RT-PCR

นำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* ผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้รับประมาณ 276 คู่เบส โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *actin* ในเมล็ดอ่อนของข้าวดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Go Taq	1X	10
2 μ M F_ Actin	0.4 μ M	4
2 μ M R_ Actin	0.4 μ M	4
cDNA Template	-	2
Total	-	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 28 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC*-TM ในระดับ mRNA ในเมล็ด
อ่อนข้าวด้วยเทคนิค semiquantitative-RT-PCR

นำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่
จำเพาะต่อยีน *glgC*-TM ผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้รับประมาณ 662 คู่เบส โดยมีองค์ประกอบ
ของ PCR ในการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *glgC* - TM โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน
glgC - TM ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Go Taq	1X	10
10 μ M F-G-TM	0.5 μ M	1
10 μ M R-G-TM	0.5 μ M	1
Template cDNA	-	2
dH ₂ O	-	6
Total	-	20

สภาวะ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 28 รอบ
Annealing	62 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extention	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extention	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Set	20 องศาเซลเซียส	12 hr	

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนโดยเทคนิค Western blot

นำเมล็ดข้าวจากต้นข้าวที่มีผลบวกจากเทคนิค PCR และเทคนิค RT - PCR มาสกัดโปรตีนทั้งหมดและแยกโปรตีนขนาดต่างๆ โดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis หลังจากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากเจลไปบนแผ่นเมมเบรน และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GlgC - TM โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน GlgC - TM

การสกัดโปรตีนจากเมล็ดอ่อนข้าว

- 1 บดเมล็ดอ่อนข้าวให้ละเอียด ด้วยไนโตรเจน
- 2 เติม Extraction buffer (ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 25 มิลลิโมลาร์ NaCl 100 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในโถงบด และผสมให้เข้ากัน
- 3 ตูดกลับใส่หลอดไมโครทิวป์ ผสมด้วยเครื่อง vortex
- 4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 5 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
- 6 ตูดส่วนใส (โปรตีน) ใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน และทำ Western Blotting

การวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้เครื่อง Microplate Reader รุ่น 680XR ตาม

คู่มือ Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad, USA)

1 เตรียม dye reagent โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง Dye Reagent Concentrate กับน้ำกลั่นที่ 1 ต่อ 4

2 กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1

3 เตรียมโปรตีนมาตรฐาน (standard BSA) เพื่อใช้เป็นตัวแทนของสารละลายโปรตีนที่จะทดสอบ โดยเตรียมตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1-1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

4 วิเคราะห์โปรตีน โดยปิเปตโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างมา อย่างละ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมใน Micropate โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

5 เติม dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมผสมให้เข้ากัน

6 บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง

7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การแยกโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE

1 เตรียมเจลด้วยเครื่อง Vertical Electrophoresis (Mini-PROTEIN 3 cell Bio Rad) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ 10% Separating gel กับ 5% Stacking gel

2 ผสมตัวอย่าง 15 ไมโครลิตร กับ 6X SDS loading buffer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย 18 ไมโครลิตร

3 นำไปต้ม นาน 3 - 5 นาที

4 ปิเปตตัวอย่างลงในช่องเจล

5 ให้กระแสไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นปรับขึ้นเป็น 150 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

การย้ายโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรนและ Western blot

1 นำเมมเบรนชนิด PVDF มาแช่ในเมทานอลก่อน ประมาณ 5 นาที

2 นำเอาแผ่น PAD กระดาษกรอง และแผ่นเมมเบรนมาแช่ใน Transfer buffer อย่างน้อย 15 นาที

3 นำเจลจากเทคนิค SDS-PAGE มาแช่ใน Transfer buffer

4 ประกอบ gel, membrane, filter papers และ PAD

5 ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 350 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที โดยใช้เครื่อง Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio Rad)

6 แยก Crude Protein บน 10% SDS-PAGE แล้วย้ายลงแผ่น PVDF membrane

7 นำแผ่น membrane มาล้างด้วย TBS buffer 2 ครั้งๆละ 10 นาที

8 นำแผ่น membrane บ่มใน 3% non-fat milk ใน TBS buffer (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 150 mM NaCl) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

9 นำแผ่น membrane บ่มกับ immunoaffinity purified anti-GlgC-TM antibody (1:50 dilution in 3% non-fat milk in TBS buffer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10 ล้างแผ่น membrane 3 ครั้งๆละ 15 นาที ใน TBST (ประกอบด้วย TBS และ 0.01% Tween 20)

11 ล้างแผ่น membrane ด้วย TBS buffer เป็นเวลา 5 นาที

12 นำแผ่น membrane บ่มกับ goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:1,000 dilution in 3% non-fat milk in TBS buffer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

13 ล้างแผ่น membrane ด้วย TBST 3 ครั้งๆละ 15 นาที

14 ล้างแผ่น membrane ด้วย TBS buffer เป็นเวลา 5 นาที

15 ทำปฏิกิริยา antigen-antibody โดยใช้ chemiluminescence detection kit (Amersham, UK)

16 นำแผ่น membrane ไปประกบฟิล์ม

6. การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนสู่รุ่นลูกและการกระจายตัวของยีน

นำเมล็ดแก่รุ่น T₁ ของต้นข้าวที่ให้ผลบวก เมื่อทดสอบด้วยวิธี GUS Assay และ PCR มาเพาะให้งอกในน้ำเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้น ย้ายต้นกล้าปลูกลงดิน ประมาณ 2 สัปดาห์ ตัดชิ้นส่วนใบมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA* โดยเทคนิค GUS Assay และนำไปมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอตรวจสอบยีน *glgC-TM* ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำผลการแสดงออกของยีน *gusA* และผล PCR ทั้งบวกและลบมาวิเคราะห์หาค่า χ^2

7. การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับต้นข้าวปกติ

ทำการปลูกต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₂ ในโรงเรือนกระจก แล้วทำการ
เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้

- 1 ความสูงต้น โดยการวัดในหน่วยเซนติเมตร
- 2 จำนวนต้นตอกอ โดยการนับจำนวนต้นตอกอ
- 3 วันออกดอก โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า
- 4 จำนวนช่อดอก โดยการนับจำนวนช่อดอก
- 5 จำนวนรวง โดยการนับจำนวนรวง
- 6 จำนวนเมล็ดต่อรวง โดยการนับจำนวนเมล็ดในแต่ละรวง
- 7 น้ำหนักเมล็ด โดยอบเมล็ดข้าวที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจาก
นึ่งนำเมล็ดข้าว 100 เมล็ด ซึ่งด้วยเครื่องซึ่ง 4 ตำแหน่ง

8. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ AGPase

- 1 สกัดโปรตีนจากเมล็ดอ่อนข้าว ระยะน้ำนม (milky stage) อายุ 10-15 วัน หลัง
pollination น้ำหนัก 200 มิลลิกรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งเย็น
- 2 เติม Extraction buffer 1 ml (ประกอบด้วย 50 mM HEPEs-NaOH pH 7.4, 5 mM
MgCl₂, 2 mM EDTA, 12.5% (V/V) glycerol, 5% (W/V) PVP-40, 50 mM 2-mercaptoethanol)
- 3 ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส 10,000 g เป็นเวลา 20 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่
สำหรับนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์
- 4 เตรียม Reaction mixture สำหรับวิเคราะห์ (ประกอบด้วย 100 mM HEPEs-NaOH
pH 7.4, 1.2 mM ADP-glucose, 3 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate
(PPI), 5 mM MgCl₂, 4mM DTT ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 275 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- 5 เติมเอนไซม์ที่สกัดได้ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 6 หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอด reaction จุ่มลงในน้ำเดือด 1 นาที
- 7 นำมาทำให้เย็นโดยแช่ลงในน้ำอุณหภูมิห้องทันที

8 ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสให้หมดใหม่ 300 ไมโครลิตร

9 เติม 7.5 ไมโครลิตร ของ 10 mM NADP เติม 0.5 ไมโครลิตร P-glucomutase และ 0.5 ไมโครลิตร G6P dehydrogenase เติม 50 mM HEPES-NaOH pH 7.4 150 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 10 นาที 30 นาที และ 1 ชั่วโมง

10 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

9. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดในเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน นำเมล็ดมาข้าวมา กะเทาะเมล็ด บดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูตรงกลาง 0.5 ไมครอน ส่งตัวอย่างแป้งวิเคราะห์ที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน วิเคราะห์โดยใช้วิธี Glucoamylase method, AACC (1990)

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติ ด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และจัดกลุ่มของข้อมูล ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม STATGRAPHIC Plus 3.0

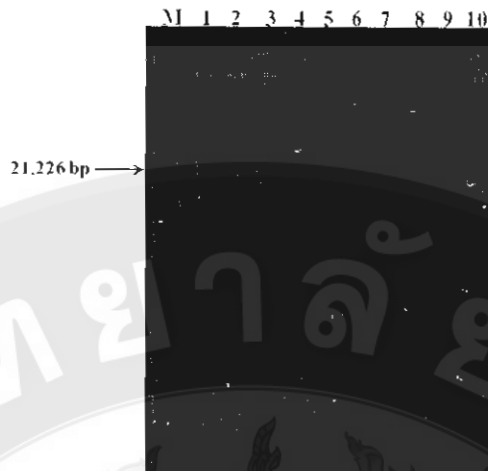
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 และ pCS8 ทำให้ได้ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (ช่อทิพา และคณะ, 2554) ในงานวิจัยนี้ได้นำต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *glgC-TM* ในจีโนมข้าว การแสดงออกของยีน การถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก ลักษณะฟีโนไทป์ น้ำหนักเมล็ด กิจกรรมเอนไซม์ AGPase และปริมาณแป้งทั้งหมดในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยได้ผลการทดลองดังนี้

การวิเคราะห์ยีนในต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot

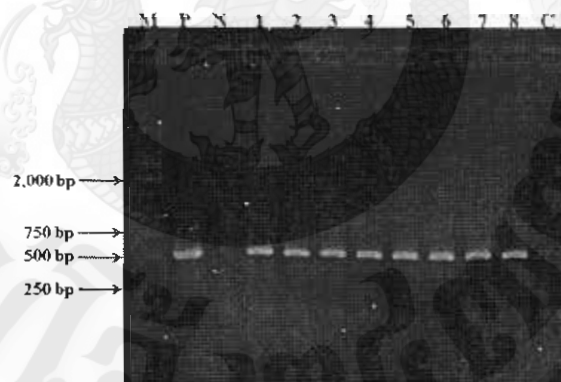
ผลการตรวจสอบยีน *gusA* และยีน *hptII* ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303

สกัดจีโนมดีเอ็นเอจากใบข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 และด้านทานต่อไฮโกรมัยซิน ด้วยวิธี mCTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) พบว่าจีโนมดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี (ภาพ 10) นำจีโนมดีเอ็นเอมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาด 500 bp (ภาพ 11) ตามที่คาดหมาย และทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII* พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาด 750 bp (ภาพ 12) ตามที่คาดหมาย แสดงว่า ต้นข้าว Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ได้รับ พลาสมิด pCAMBIA1303 เนื่องจากหลังตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า มียีน *gusA* และยีน *hptII*



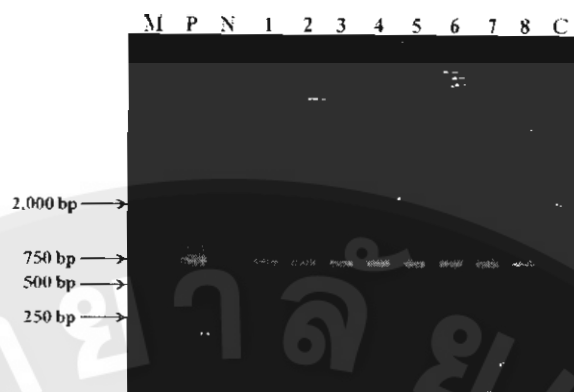
ภาพ 10 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่สกัดโดยวิธี mCTAB ดัดแปลง ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda DNA ladder *HindIII/EcoRI* เลน 1-2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 3-10 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ต้น 1303-2, 1303-3, 1303-4, 1303-5, 1303-6, 1303-7, 1303-8, 1303-10 ตามลำดับ



ภาพ 11 การวิเคราะห์ยีน *gusA* ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ด้วยเทคนิค PCR

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder เลน P คือ พลาสมิด pCAMBIA1303 (Positive control) เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 1-8 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ต้น 1303-2, 1303-3, 1303-4, 1303-5, 1303-6, 1303-7, 1303-8, 1303-10 ตามลำดับ เลน C คือ น้ำ



ภาพ 12 การวิเคราะห์ยีน *hptII* ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ด้วยเทคนิค PCR

เลน M คือ แยกดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder เลน P คือ พลาสมิด pCAMBIA1303 (Positive control) เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 1-8 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 ดัน 1303-2, 1303-3, 1303-4, 1303-5, 1303-6, 1303-7, 1303-8, 1303-10 ตามลำดับ เลน C คือ น้ำ

ผลการวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *glgC* -TM ในจีโนมของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ด้วยเทคนิค Southern blot

จากการทดลองของ พูนศรี (2553) ซึ่งทำการถ่ายยีน *glgC*-TM เข้าสู่เซลล์ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ภายหลังจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gusA* ในใบข้าว และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ได้ต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมที่คาดว่าจะมียีน *glgC*-TM แทรกในจีโนม จำนวน 4 ต้น ได้แก่ CS8-1, CS8-2, CS8-3, CS8-4 จึงได้นำต้นข้าวดังกล่าวมายืนยันการแทรกตัวของยีน *glgC*-TM ในจีโนมข้าว และตรวจสอบจำนวนชุดยีนในจีโนม โดยเทคนิค Southern blot

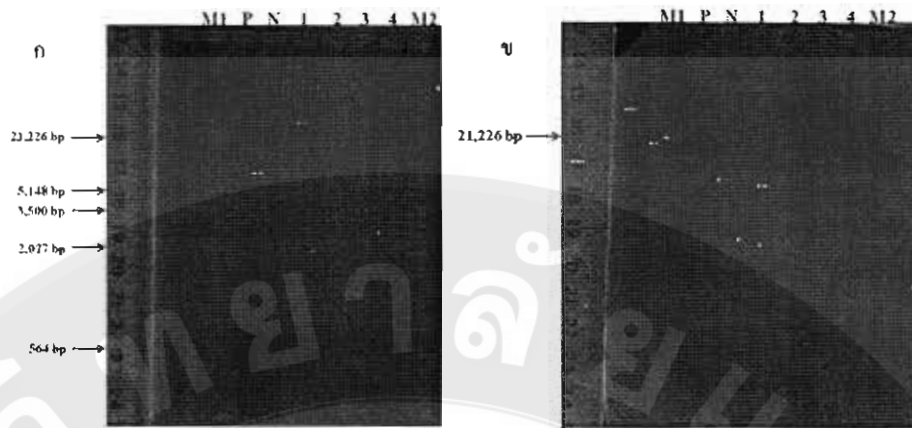
นำใบข้าวจากต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน มีการแสดงออกของยีน *gusA* และผล PCR ของยีน *glgC*-TM เป็นบวก มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบ ด้วยวิธี mCTAB (ภาพ 13) นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาย่อยข้ามคั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* แยกดีเอ็นเอตามขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เอนไซม์ *EcoRV* สามารถตัดจีโนมิกดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปบนเมมเบรน Nytran SuPercharge nylon transfer membrane (ภาพ 14) ใช้ probe ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *glgC*-TM ที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin (DIG) โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit ใช้ไพรเมอร์ F_G-TM และ R_G-TM ทำให้ได้ probe ขนาดประมาณ 662 bp

จากผลการทดสอบต้นข้าวทั้ง 4 ต้น พบว่า ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 3,500 bp เท่ากัน ทั้ง 4 ต้น (ภาพ 15) เนื่องจากมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* ในบริเวณ T-DNA 2 ตำแหน่ง และทั้งสองตำแหน่งอยู่ห่างประมาณ 3,500 bp แสดงว่า มีการแทรกของยีน *glgC-TM* ในจีโนมข้าวทั้ง 4 ต้น แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า ยีนมีการเข้าแทรกในตำแหน่งใดของจีโนม และมีจำนวนกี่ชุด เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ไม่ได้ตัดเพียง 1 ตำแหน่งในบริเวณ T-DNA ของ พลาสมิด pCS8 ทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ต้นข้าวทั้ง 4 ต้นเป็น independent transgenic lines



ภาพ 13 การวิเคราะห์จีโนมดีเอ็นเอจากใบข้าวที่สกัดด้วยวิธี mCTAB ดัดแปลง ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

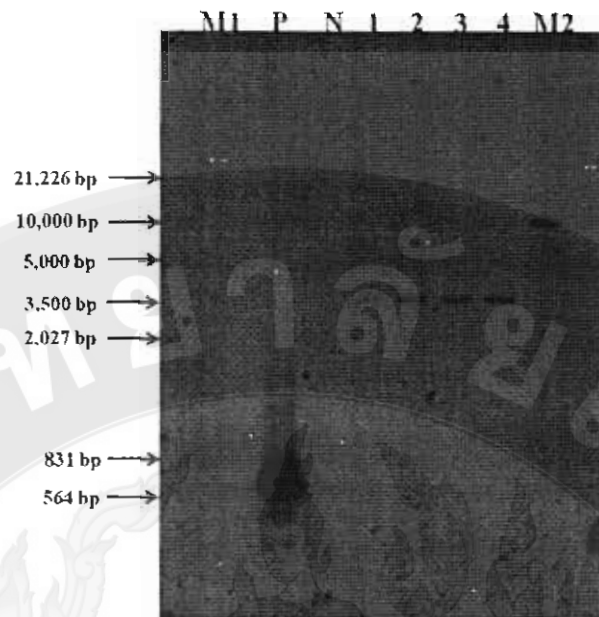
เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda DNA ladder *HindIII/EcoRI* เลน 1 คือ จีโนมดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ Sasanishiki ต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 2 – 5 คือ จีโนมดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ผ่านการถ่ายยีนต้นที่ CS8-1, CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ



ภาพ 14 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังแยกขนาดด้วยเทคนิคเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ก) แยกดีเอ็นเอตามขนาดหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสก่อนย้ายไปบนเมมเบรน ข) หลังย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปบนเมมเบรน Nytran SuPercharge nylon transfer membrane โดยวิธี capillary transfer method

เลน M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda DNA ladder *HindIII/EcoRI* เลน P คือ PCR positive control เจือจาง 1:1000 เลน N คือ จีโนมิกดีเอ็นเอข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* เลน 1 – 4 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* ต้นที่ CS8-1, CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ เลน M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder



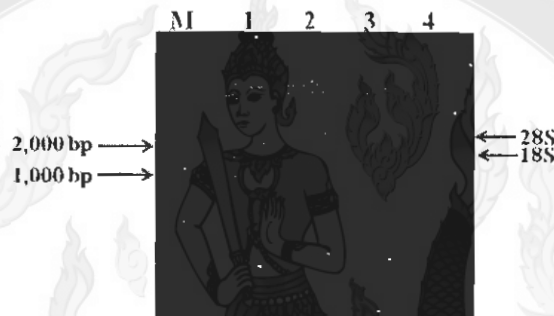
ภาพ 15 การวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *glgC* -TM ในจีโนมข้าวพันธุ์ Sasanishiki ด้วยเทคนิค Southern blot

เลน M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda DNA ladder *HindIII/EcoRI* เลน P คือ PCR positive control เจือจาง 1 : 1000 เลน N คือ จีโนมดีเอ็นเอข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* เลน 1 – 4 คือ จีโนมดีเอ็นเอข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* ต้นที่ CS8-1, CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ เลน M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเมล็ดข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ด้วยเทคนิค RT-PCR และ Western blot

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC* - TM ในเมล็ดข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย
พลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด
pCS8 และมีผล PCR เป็นบวก ด้วย Trizol Reagent พบว่า ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีมีแถบอาร์
เอ็นเอขนาด 18S และ 28S ชัดเจน (ภาพ 16)

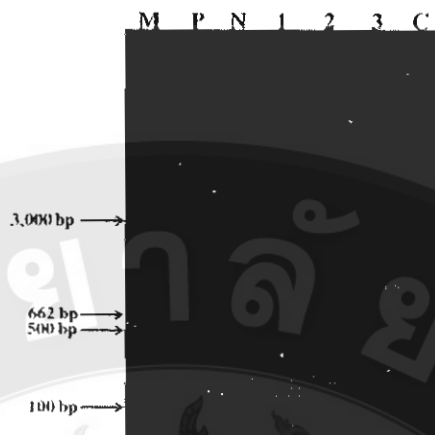


ภาพ 16 ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด
pCS8 ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus เลน 1 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ไม่ผ่านการ
ถ่ายยีน เลน 2 – 4 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 และมี
ผล PCR เป็นบวก ดังนี้ CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนข้าวด้วยเทคนิค
PCR

ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการ
นำอาร์เอ็นเอมาทำ PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ พบว่า ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 662 bp ใน
ช่องตัวอย่าง พบเพียง positive control เท่านั้นที่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 662 bp (ภาพ 17) แสดง
ว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดอ่อนข้าวไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ

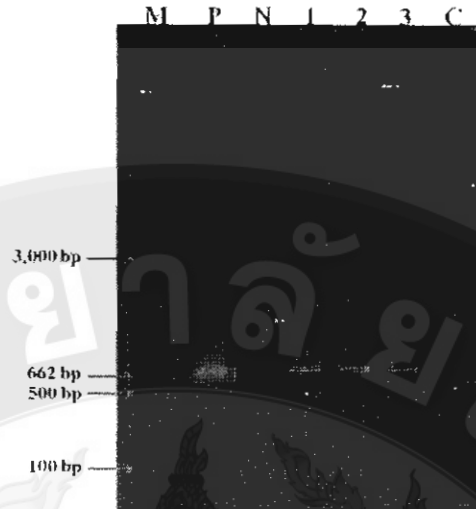


ภาพ 17 ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนของดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอตัวอย่างจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus เลน P คือ positive control (พลาสมิด pCS8) เลน N คือ อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 1 – 3 คือ อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 และมีผล PCR เป็นบวก ต้นที่ CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ เลน C คือ น้ำ

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC*-TM ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนข้าวด้วยเทคนิค RT-PCR

เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์เส้น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ Oligo-dT แล้วนำเส้น cDNA ดังกล่าวมาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC*-TM พบว่า cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ mRNA เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 662 bp แสดงว่ายีน *glgC* - TM ที่ถ่ายเข้าสู่ต้นข้าวและให้ยีนไปแสดงออกในส่วนของเอนโดสเปิร์ม มีการแสดงออกในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนข้าวทั้ง 3 ต้นได้แก่ ต้นที่ CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 (ภาพ 18) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ihemere et al. (2006) และ Wang et al. (2007) ซึ่งได้ศึกษาถ่ายยีน *glgC*16 เข้าสู่มันสำปะหลัง และข้าวโพด พบว่ายีน *glgC*16 มีการแสดงออกในระดับ mRNA ในรากมันสำปะหลัง และเมล็ดอ่อนข้าวโพด และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Smidansky et al. (2003) ศึกษาการแสดงออกของยีน *Sh2r6hs* ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ AGPase ในข้าวโพด เมื่อนำมาถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวแล้ว พบว่า ยีนมีการแสดงออกในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าว



ภาพ 18 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC* -TM ในเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิค RT - PCR

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus เลน P คือ Positive control (พลาสมิด pCS8) เลน N คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 1 – 3 คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 และมีผล PCR เป็นบวก ต้นที่ CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ เลน C คือ น้ำ

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC*-TM และยีน *actin* ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ Oligo-dT แล้วนำ cDNA ดังกล่าวมาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* ผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้มีขนาด 276 คู่เบส พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 276 bp ในปริมาณที่เท่ากัน (ภาพ 19) แสดงว่ายีน *actin* มีการแสดงออกที่เท่ากันทั้งในต้นที่ผ่านการถ่ายยีนและไม่ผ่านการถ่ายยีน ใช้เป็น Internal control

เมื่อนำ cDNA แล้วนำเส้น cDNA ดังกล่าวมาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *glgC*-TM พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 662 bp (ภาพ 19) แสดงว่ายีน *glgC* - TM ที่ถ่ายยีนเข้าสู่ต้นข้าวมีการแสดงออกในระดับ mRNA ทั้ง 3 ต้น ได้แก่ ต้นที่ CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 แต่ละต้นมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดยต้นที่ CS8-3 มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด รองลงมาคือ ต้นที่ CS8-4 และ CS8-2 ตามลำดับ



ภาพ 19 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC* -TM ในเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT – PCR

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus เลน P คือ Positive control (พลาสมิด pCS8) เลน N คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เลน 1 – 3 คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 และมีผล PCR เป็นบวก ต้นที่ CS8-2, CS8-3 และ CS8-4 ตามลำดับ เลน C คือ น้ำ

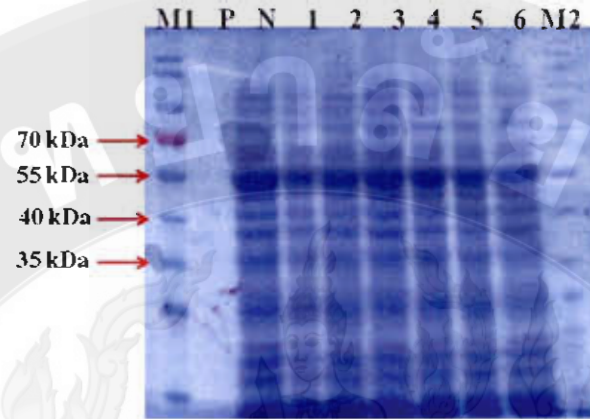
ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

นำเมล็ดแก่ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ ของต้น CS8-2-2, CS8-3-2 และ CS8-4-13 มาสกัดโปรตีน แล้วแยกโปรตีนตามขนาด และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดี Anti-GlgC-TM ที่จับกับโปรตีน GlgC-TM เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GlgC-TM ในเมล็ดข้าว

โปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดแก่ของข้าว เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Bradford พบว่า มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1.5 – 2.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และจากการตรวจสอบโปรตีน GlgC-TM ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารูปแบบของแถบโปรตีนในเมล็ดข้าวทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีลักษณะคล้ายๆ กัน (ภาพ 20)

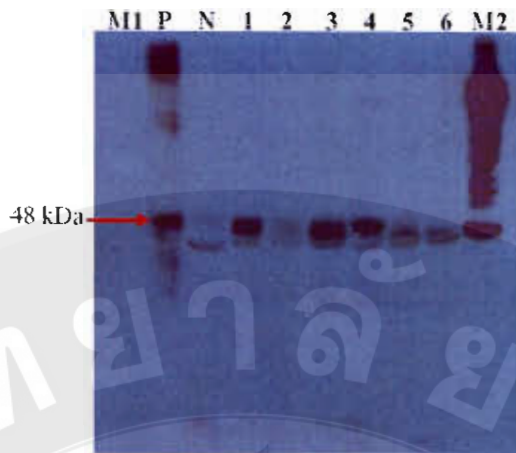
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดี Anti-GlgC-TM พบแถบโปรตีน ขนาดประมาณ 48 kDa ในเมล็ดแก่ของข้าวทั้ง 3 ต้น ที่นำมาทดสอบ (ภาพ 21) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นโปรตีน GlgC-TM เนื่องจาก มีขนาดตรงตามแถบโปรตีน purified GlgC-TM ซึ่งใช้เป็น positive control และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sakulsingharoj et al. (2004) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC*-TM เข้าสู่ข้าวโดยให้ยีนแสดงออกในส่วนของไซโตพลาสซึมหลังตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot พบแถบโปรตีนขนาด 48 kDa ซึ่งเท่ากับขนาดของโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* แสดงว่า ยีน *glgC*-TM มีการแสดงออกระดับโปรตีนในเมล็ดอ่อนของข้าว Wang et al.

(2007) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC16* เข้าสู่ข้าวโพด พบแถบโปรตีนขนาด 48 kDa ในเมล็ดอ่อนของข้าวโพด ซึ่งเท่ากับขนาดของโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Smidansky et al. (2003) ทำการถ่ายยีน *Sh2r6hs* ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ AGPase จากข้าวโพดเข้าสู่ข้าว พบว่ายีนมีการแสดงออกระดับโปรตีนในเมล็ดอ่อนของข้าว



ภาพ 20 การตรวจสอบโปรตีน GlgC-TM ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค SDS-PAGE

เลน M1 คือ PageRuler prestained ladder เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เลน 1 -3 คือ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ต้น CS8-2-2, CS8-3-2, CS8-4-13 ตามลำดับ เลน 4 -6 คือ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ต้น CS8-2-2, CS8-3-2, CS8-4-13 ตามลำดับ เลน M2 คือ PageRuler Unstain Protein ladder



ภาพ 21 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน GlgC-TM ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blot ที่ใช้แอนติบอดี Anti-GlgC-TM

เลน M1 คือ PageRuler prestained ladder เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เลน 1 -3 คือ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ต้น CS8-2-2, CS8-3-2, CS8-4-13 ตามลำดับ เลน 4 -6 คือ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ต้น CS8-2-2, CS8-3-2, CS8-4-13 ตามลำดับ เลน M2 คือ PageRuler Unstain Protein ladder

การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก

นำข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* และมียีน *glgC-TM* แทรกอยู่ในจีโนม มาตรวจสอบการถ่ายทอดฟีโนไทป์ของยีน *gusA* (ภาพ 22) และการถ่ายทอดจีโนไทป์ของยีน *glgC-TM* ไปสู่ลูกรุ่น T_1 โดยนำเมล็ดรุ่น T_1 ของต้น CS8-2 มาปลูกจำนวน 25 ต้น CS8-3 จำนวน 10 ต้น CS8-4 จำนวน 25 ต้น วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gusA* โดยวิธี GUS Assay และวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน *glgC-TM* ไปยังรุ่นลูกด้วยเทคนิค PCR พบว่าต้นที่ CS8-2 มีผล GUS+ จำนวน 21 ต้น GUS- จำนวน 4 ต้น มีผล *glgC-TM*+ จำนวน 21 ต้น *glgC-TM*- จำนวน 4 ต้น (ตาราง 2 และภาพ 23-24) จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 1.08$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่า เป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T_1 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- และอัตราส่วนจีโนไทป์ *glgC-TM*+ : *glgC-TM*- เท่ากับ 3:1 (ตาราง 3 และ 4) ต้นที่ CS8-3 มีผล GUS+ จำนวน 6 ต้น GUS- จำนวน 4 ต้น มีผล *glgC-TM*+ จำนวน 6 ต้น *glgC-TM*- จำนวน 4 ต้น (ตาราง 2 และภาพ 25-26) จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 1.2$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า มีอัตราส่วนฟีโนไทป์และจีโนไทป์เป็นแบบ 3:1 หรือไม่ เนื่องจากมีจำนวนต้นข้าวที่นำมาทดสอบน้อยเกินไป (ตาราง 5 และ 6) ต้นที่ CS8-4 มีผล GUS+ จำนวน 20 ต้น GUS- จำนวน 5 ต้น มีผล *glgC-TM*+ จำนวน 20 ต้น *glgC-TM*- จำนวน 5 ต้น (ตาราง 2 และภาพ 27-28) จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 0.33$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T_1 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- และอัตราส่วนจีโนไทป์ *glgC-TM*+ : *glgC-TM*- เท่ากับ 3:1 (ตาราง 7 และ 8)

การตรวจสอบการถ่ายทอดฟีโนไทป์ของยีน *gusA* พบว่า ต้นที่ CS8-2 และ CS8-4 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ของรุ่นลูกที่ให้ผล GUS+ : GUS- คิดเป็น 3:1 (ตาราง 9) ส่วน ต้นที่ CS8-3 ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า มีอัตราส่วนฟีโนไทป์เป็นแบบ 3:1 หรือไม่ เนื่องจากมีจำนวนต้นข้าวที่นำมาทดสอบน้อยเกินไป (10 ต้น) จึงทำให้ค่า χ^2 ที่ได้ยังไม่น่าเชื่อถือ

การตรวจสอบการส่งถ่ายยีน *glgC-TM* ไปยังรุ่นลูก พบว่า ต้นข้าว ต้นที่ CS8-2 และ CS8-4 มีอัตราส่วนจีโนไทป์ *glgC-TM*+ : *glgC-TM*- คิดเป็น 3:1 (ตาราง 10) ส่วน ต้นที่ CS8-3 ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า มีอัตราส่วนจีโนไทป์เป็นแบบ 3:1 หรือไม่ เนื่องจากมีจำนวนต้นข้าวที่นำมาทดสอบน้อยเกินไป (10 ต้น) จึงทำให้ค่า χ^2 ที่ได้ยังไม่น่าเชื่อถือ

จากการตรวจสอบการส่งถ่ายพีโนไทป์ไปสู่รุ่นลูกของยีน *gusA* พบว่า มีการส่งถ่ายพีโนไทป์ไปสู่รุ่นลูกในอัตราส่วน 3:1 การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนไปสู่รุ่นลูกของยีน *glgC-TM* พบว่า มีการส่งถ่ายยีนไปสู่รุ่นลูกในอัตราส่วน 3:1 ซึ่งเป็นไปตามกฎของเมนเดลข้อที่หนึ่ง แสดงว่า ยีน *glgC-TM* มีการแทรกตัวในจีโนมของข้าวต้นที่ CS8-2 และ CS8-4 โดยอาจจะมียีนแทรกในจีโนม 1 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hiei et al. (1994) ซึ่งได้ถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์จาปอนิกา โดยใช้เอนไซม์โคโรนาที่เรียม พบว่า ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนแทรกในจีโนม 1 ตำแหน่ง มีอัตราส่วนของรุ่นลูกที่ให้ผล GUS⁺ : GUS⁻ และ Hyg^R : Hyg^S ในอัตราส่วน 3:1 เช่นเดียว

ตาราง 2 สรุปการวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ โดยเทคนิค GUS Assay และเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *glgC-TM*

ต้นที่	GUS	<i>glgC-TM</i>	ต้นที่	GUS	<i>glgC-TM</i>	ต้นที่	GUS	<i>glgC-TM</i>
2-1	+	+	3-1	+	+	4-1	+	+
2-2	+	+	3-2	+	+	4-2	-	-
2-3	+	+	3-3	+	+	4-3	+	+
2-4	+	+	3-4	+	+	4-4	+	+
2-5	+	+	3-5	-	-	4-5	+	+
2-6	-	-	3-6	-	-	4-6	+	+
2-7	+	+	3-7	+	+	4-7	+	+
2-8	+	+	3-8	-	-	4-8	+	+
2-9	+	+	3-9	+	+	4-9	+	+
2-10	+	+	3-10	-	-	4-10	+	+
2-11	+	+				4-11	+	+
2-12	+	+				4-12	+	+
2-13	+	+				4-13	+	+
2-14	+	+				4-14	+	+
2-15	+	+				4-15	+	+
2-16	+	+				4-16	+	+
2-17	+	+				4-17	-	-
2-18	+	+				4-18	+	+
2-19	-	-				4-19	+	+
2-20	-	-				4-20	-	-
2-21	+	+				4-21	-	-
2-22	-	-				4-22	-	-
2-23	+	+				4-23	+	+
2-24	+	+				4-24	+	+
2-25	+	+				4-25	+	+

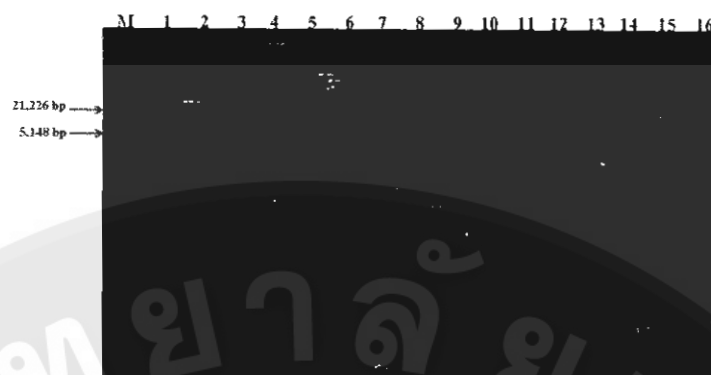
หมายเหตุ : ในช่อง GUS+ คือ เกิดสีฟ้า GUS- คือ ไม่เกิดสีฟ้า ในช่อง *glgC*-TM+ คือ มีการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *glgC*-TM *glgC*-TM- คือ ไม่มีการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *glgC*-TM
 ต้นที่ 2-1 ถึงต้นที่ 2-25 คือ ต้น CS8-2 รุ่น T, ต้นที่ 1 ถึง ต้นที่ 25
 ต้นที่ 3-1 ถึงต้นที่ 3-10 คือ ต้น CS8-3 รุ่น T, ต้นที่ 1 ถึง ต้นที่ 10
 ต้นที่ 4-1 ถึงต้นที่ 4-25 คือ ต้น CS8-4 รุ่น T, ต้นที่ 1 ถึง ต้นที่ 25



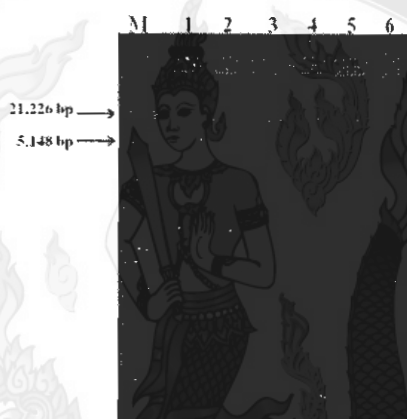
ก

ข

ภาพ 22 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA* ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T, ก) คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับยีน ข) คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ได้รับยีน *gusA*

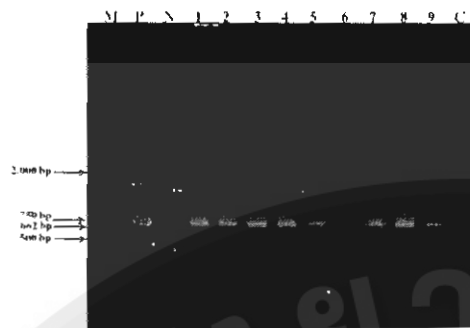


ก)

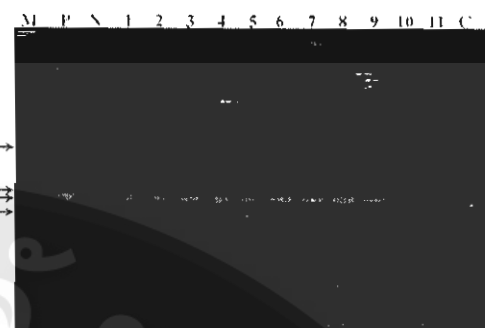


ข)

ภาพ 23 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ตัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-2 ก) เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA ladder *Hind*III/*Eco*RI เลน 1-2 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 3-16 คือ ต้น CS8-2-1 – CS8-2-14 ข) เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA ladder *Hind*III/*Eco*RI เลน 1-6 คือ ต้น CS8-2-15 – CS8-2-20



ก)

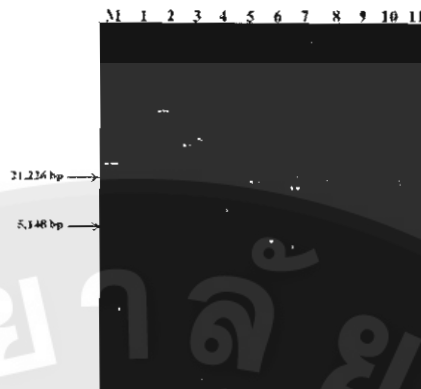


ข)



ค)

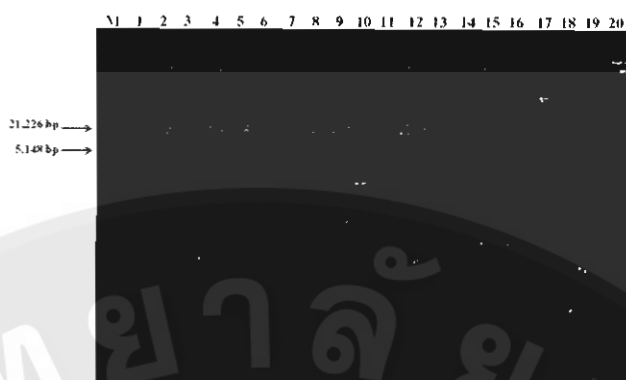
ภาพ 24 การวิเคราะห์ยีน *glgC*-TM ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-2 ก) เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder เลน P คือ พลาสมิด pCS8 ซึ่งใช้เป็น positive control เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 1-10 คือ ต้น CS8-2-1 – CS8-2-9 เลน C คือ น้ำ ข) เลน 1-11 คือ ต้น CS8-2-10 – CS8-2-20 ค) เลน 1-5 คือ ต้น CS8-2-21 – CS8-2-25



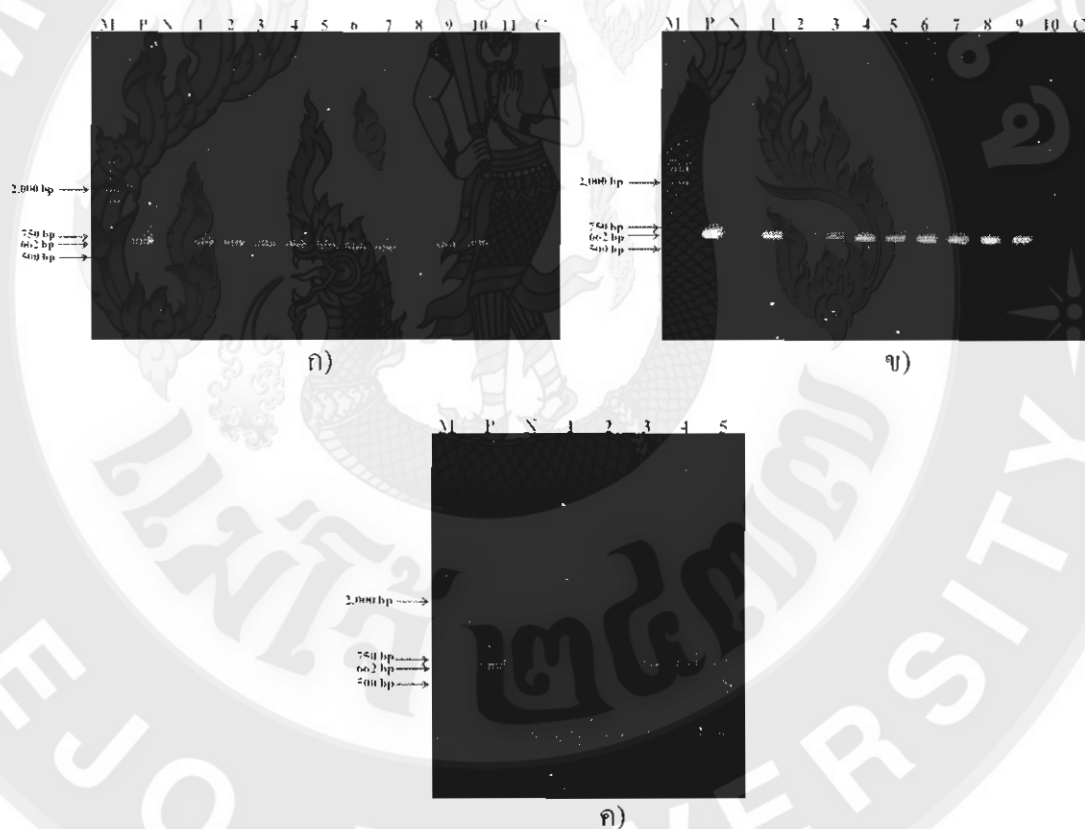
ภาพ 25 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-3 เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA ladder *HindIII/EcoRI* เลน 1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 2-11 คือ ต้น CS8-3-1 – CS8-3-10



ภาพ 26 การวิเคราะห์ยีน *glgC-TM* ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-3 n) เลน M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder เลน P คือ พลาสมิด pCS8 ซึ่งใช้เป็น positive control เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 1-10 คือ ต้นที่ CS8-3-1 – CS8-3-10 เลน C คือ น้ำ



ภาพ 27 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-4 เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA ladder *HindIII/EcoRI* เลน 1-20 คือ ต้น CS8-4-1 – CS8-4-20



ภาพ 28 การวิเคราะห์ยีน *glgC-TM* ในข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-4 ก) เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder เลน P คือ พลาสมิด pCS8 ซึ่งใช้เป็น positive control เลน N คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 1-10 คือ ต้น CS8-4-1 – CS8-4-10 เลน C คือ น้ำ ข) เลน 1-11 คือ ต้นที่ CS8-4-10 – CS8-4-20 ค) เลน 1-5 คือ ต้นที่ CS8-4-21 – CS8-4-25

ตาราง 3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-2 อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหวังรุ่น T₁ คือ GUS+ : GUS- เท่ากับ 3:1

ฟีโนไทป์ของรุ่น T ₁	O	E	O - E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
GUS+	21	3/4×25 = 18.75	2.25	5.06	0.27
GUS-	4	1/4×25 = 6.25	-2.25	5.06	0.81
รวม	25				$\chi^2 = 1.08$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า $\chi^2_{0.05, 1} = 3.841$ จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 1.08$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T₁ มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- เท่ากับ 3:1

หมายเหตุ : O คือ ค่าสังเกต E คือ ค่าคาดหวังทางทฤษฎี

ตาราง 4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-2 อัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหวังรุ่น T₁ คือ *glgC*-TM+ : *glgC*-TM- เท่ากับ 3:1

จีโนไทป์ของรุ่น T ₁	O	E	O - E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
<i>glgC</i> -TM+	21	3/4×25 = 18.75	2.25	5.06	0.27
<i>glgC</i> -TM-	4	1/4×25 = 6.25	-2.25	5.06	0.81
รวม	25				$\chi^2 = 1.08$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า $\chi^2_{0.05, 1} = 3.841$ จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 1.08$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T₁ มีอัตราส่วนจีโนไทป์ *glgC*-TM+ : *glgC*-TM- เท่ากับ 3:1

ตาราง 5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-3 อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหวังรุ่น T₁ คือ GUS+ : GUS- เท่ากับ 3:1

ฟีโนไทป์ของรุ่น T ₁	O	E	O - E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
GUS+	6	3/4×10 = 7.5	-1.5	2.25	0.3
GUS-	4	1/4×10 = 2.5	1.5	2.25	0.9
รวม	10				$\chi^2 = 1.2$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า $\chi^2_{0.05, 1} = 3.841$ จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 1.2$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T₁ มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- เท่ากับ 3:1

ตาราง 6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-3 อัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหวังรุ่น T₁ คือ *glgC*-TM+ : *glgC*-TM- เท่ากับ 3:1

จีโนไทป์ของรุ่น T ₁	O	E	O - E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
<i>glgC</i> -TM+	6	3/4×10 = 7.5	-1.5	2.25	0.3
<i>glgC</i> -TM-	4	1/4×10 = 2.5	1.5	2.25	0.9
รวม	10				$\chi^2 = 1.2$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า $\chi^2_{0.05, 1} = 3.841$ จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 1.2$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T₁ มีอัตราส่วนจีโนไทป์ *glgC*-TM+ : *glgC*-TM- เท่ากับ 3:1

ตาราง 7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-4 อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T₁ คือ GUS+ : GUS- เท่ากับ 3:1

ฟีโนไทป์ของรุ่น T ₁	O	E	O - E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
GUS+	20	3/4×25 = 18.75	1.25	1.56	0.08
GUS-	5	1/4×25 = 6.25	-1.25	1.56	0.25
รวม	25				$\chi^2 = 0.33$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า $\chi^2_{0.05, 1} = 3.841$ จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 0.33$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T₁ มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- เท่ากับ 3:1

ตาราง 8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square test ของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น T₁ ต้นที่ CS8-4 อัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T₁ คือ *glgC*-TM+ : *glgC*-TM- เท่ากับ 3:1

จีโนไทป์ของรุ่น T ₁	O	E	O - E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
<i>glgC</i> -TM+	20	3/4×25 = 18.75	1.25	1.56	0.08
<i>glgC</i> -TM-	5	1/4×25 = 6.25	-1.25	1.56	0.25
รวม	25				$\chi^2 = 0.33$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า $\chi^2_{0.05, 1} = 3.841$ จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 0.33$ มีค่าน้อยกว่าค่า $\chi^2_{0.05, 1}$ แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T₁ มีอัตราส่วนจีโนไทป์ *glgC*-TM+ : *glgC*-TM- เท่ากับ 3:1

ตาราง 9 สรุปการวิเคราะห์การถ่ายทอดฟีโนไทป์ของยีน *gusA* ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม
จากรุ่น T_0 ไป T_1

ข้าวรุ่น T_0	อัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS-	χ^2	อัตราส่วนฟีโนไทป์
CS8-2	21 : 4	1.08	3 : 1
CS8-3	6 : 4	1.2	3 : 1
CS8-4	20 : 5	0.33	3 : 1

หมายเหตุ วิเคราะห์ค่า χ^2 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ตาราง 10 สรุปการวิเคราะห์การถ่ายทอดจีโนไทป์ของยีน *glgC-TM* ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม
จากรุ่น T_0 ไป T_1

ข้าวรุ่น T_0	อัตราส่วนจีโนไทป์ <i>glgC-TM+</i> : <i>glgC-TM-</i>	χ^2	อัตราส่วนจีโนไทป์
CS8-2	21 : 4	1.08	3 : 1
CS8-3	6 : 4	1.2	3 : 1
CS8-4	20 : 5	0.33	3 : 1

หมายเหตุ วิเคราะห์ค่า χ^2 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นข้าว พันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับต้นข้าวปกติ

การศึกษากการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าว Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ โดยได้ทำการปลูกข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 (ต้นข้าว 1303) รุ่น T₁ และข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 (ต้นข้าว CS8) รุ่น T₂ เปรียบเทียบกับข้าว Sasanishiki ปกติที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ทำการปลูกโดยเพาะเมล็ด และปลูกลงดินพร้อมกัน แล้วจึงทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ ความสูงของต้น จำนวนต้นตอกอ วันออกดอก จำนวนช่อดอกต่อกอ จำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดต่อรวง และน้ำหนักเมล็ด

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₂ พบว่า จำนวนช่อดอก จำนวนรวงของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมและต้นข้าวปกติไม่แตกต่างกัน ประมาณ 9-14 รวงต่อกอ ความสูงของต้น ต้น CS8-2 มีความสูงไม่แตกต่างกับปกติประมาณ 111-112 เซนติเมตร แต่ต้นดัดแปลงพันธุกรรม 1303 CS8-3 และ CS8-4 มีความสูงน้อยกว่าต้นปกติประมาณ 90-108 เซนติเมตร จำนวนต้นตอกอ ต้นดัดแปลงพันธุกรรม CS8-2 CS8-3 และ CS8-4 มีจำนวนต้น 13-16 ต้นตอกอ ซึ่งมากกว่าต้นปกติ แต่ต้น 1303 มี 9 ต้นตอกอ น้อยกว่าต้นปกติ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 11 และภาพ 29) อายุวันออกดอกต้นข้าวปกติใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด 73 วัน ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ใช้ระยะเวลาประมาณ 75-80 วัน (ตาราง 11) ต้นข้าวปกติ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม 1303 และ ต้นข้าว CS8 มาจากการเพาะเมล็ดเหมือนกัน จึงทำให้มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มยีนจากแบคทีเรียเข้าสู่จีโนมข้าว อาจจะไม่ีผลต่อการเจริญเติบโตของลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นข้าว ซึ่งต่างกับผลการทดลองของ Smidansky et al. (2003) ศึกษาการถ่ายยีน *Sh2r6hs* ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ AGPase จากข้าวโพดเข้าสู่ข้าว นอกจากจะเพิ่มน้ำหนักเมล็ดข้าวได้แล้ว มวลทั้งหมดของต้นยังเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการศึกษาลักษณะผลผลิต พบว่าต้นข้าว 1303 มีน้ำหนักเมล็ดไม่แตกต่างกับต้นปกติ ต้น CS8-2-2 CS8-2-16 และ CS8-2-18 มีน้ำหนักเมล็ดต่ำกว่าต้นปกติ 3 7 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าต้นปกติอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ต้นที่ CS8-3-1 CS8-3-2 และ CS8-4-13 ที่มีน้ำหนักเมล็ดมากกว่าต้นข้าวปกติ 6 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อยกว่าต้นปกติ (ตาราง 12) ซึ่งลักษณะที่มีการแสดงออกเกี่ยวกับจำนวนเมล็ดต่อรวงที่เพิ่มขึ้นของ ต้นที่ CS8-2 และจำนวนเมล็ดต่อรวงไม่เพิ่มขึ้นแต่

น้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้นของต้น CS8-3 และ CS8-4 อาจเนื่องมาจาก ตำแหน่งของการแทรกตัวของ ยีนในจีโนมข้าวซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *glgC-TM* ต่อปริมาณผลผลิตที่ได้ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นทั้งจำนวนเมล็ดต่อรวงและน้ำหนักเมล็ดล้วนแต่เป็นการเพิ่มผลผลิตของข้าว เนื่องจากการแทรกยีน *glgC-TM* เข้าสู่จีโนมข้าว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sakulsingharoj et al. (2004) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC-TM* เข้าสู่ข้าวโดยให้ยีนแสดงออกใน ส่วนของไซโตพลาสซึม พบว่า สามารถเพิ่มน้ำหนักเมล็ดได้ 11% Smidansky et al. (2003) พบว่า หลังถ่ายยีน *Sh2r6hs* ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ AGPase จากข้าวโพดเข้าสู่ข้าว ทำให้สามารถเพิ่ม น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และมวลทั้งหมดของต้นเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ แต่เปอร์เซ็นต์แป้งไม่เพิ่มขึ้น Wang et al. (2007) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC16* เข้าสู่ข้าวโพด พบว่า สามารถเพิ่มน้ำหนักเมล็ด ข้าวโพดได้ 13-25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นควบคุม และ Ihemere et al. (2006) ได้ศึกษาการ ถ่ายยีน *glgC* เข้าสู่มันสำปะหลัง พบว่า สามารถเพิ่มน้ำหนักรากมันสำปะหลังได้ 52-166 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มจำนวนรากมันสำปะหลัง จากต้นปกติ 7 รากต่อต้น เป็น 8-12 รากต่อต้น ใน ต้นมันสำปะหลังดัดแปลงพันธุกรรม

ตาราง 11 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

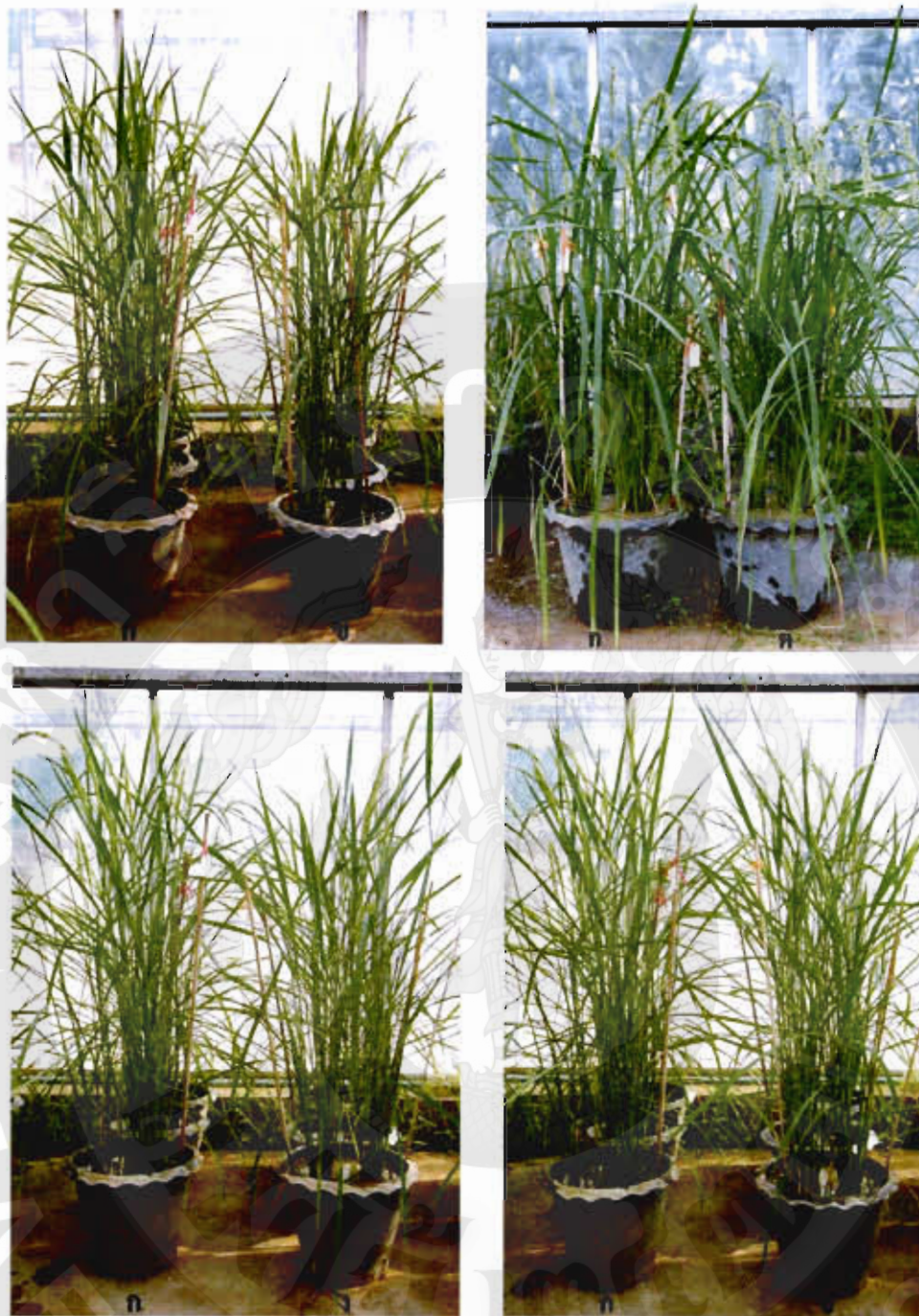
ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มขึ้น	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนต้นต่อ กอ	วันออกดอก (วัน)	จำนวนช่อ ดอก	จำนวนรวง
ต้นข้าวปกติ	-	-	112.5 ^a	11 ^{bc}	73 ^a	11 ^{ab}	11 ^{ab}
pCAMBIA1303	pCAMBIA1303	<i>gusA, hptII</i>	108.25 ^{ab}	9 ^c	76 ^c	9 ^b	9 ^b
CS8-2-2	pCS8	<i>gusA, hptII, glgC-TM</i>	111 ^a	16 ^a	77 ^d	14 ^a	14 ^a
CS8-2-16	pCS8	<i>gusA, hptII, glgC-TM</i>	112 ^a	10 ^{bc}	76 ^c	10 ^{ab}	10 ^{ab}
CS8-2-18	pCS8	<i>gusA, hptII, glgC-TM</i>	111 ^a	14 ^{abc}	75 ^b	10 ^{ab}	10 ^{ab}
CS8-3-1	pCS8	<i>gusA, hptII, glgC-TM</i>	105.25 ^{ab}	13 ^{abc}	75 ^b	10 ^{ab}	10 ^{ab}
CS8-3-2	pCS8	<i>gusA, hptII, glgC-TM</i>	100.75 ^b	15 ^{ab}	75 ^b	12 ^{ab}	12 ^{ab}
CS8-4-13	pCS8	<i>gusA, hptII, glgC-TM</i>	90 ^c	14 ^{abc}	80 ^e	10 ^{ab}	10 ^{ab}

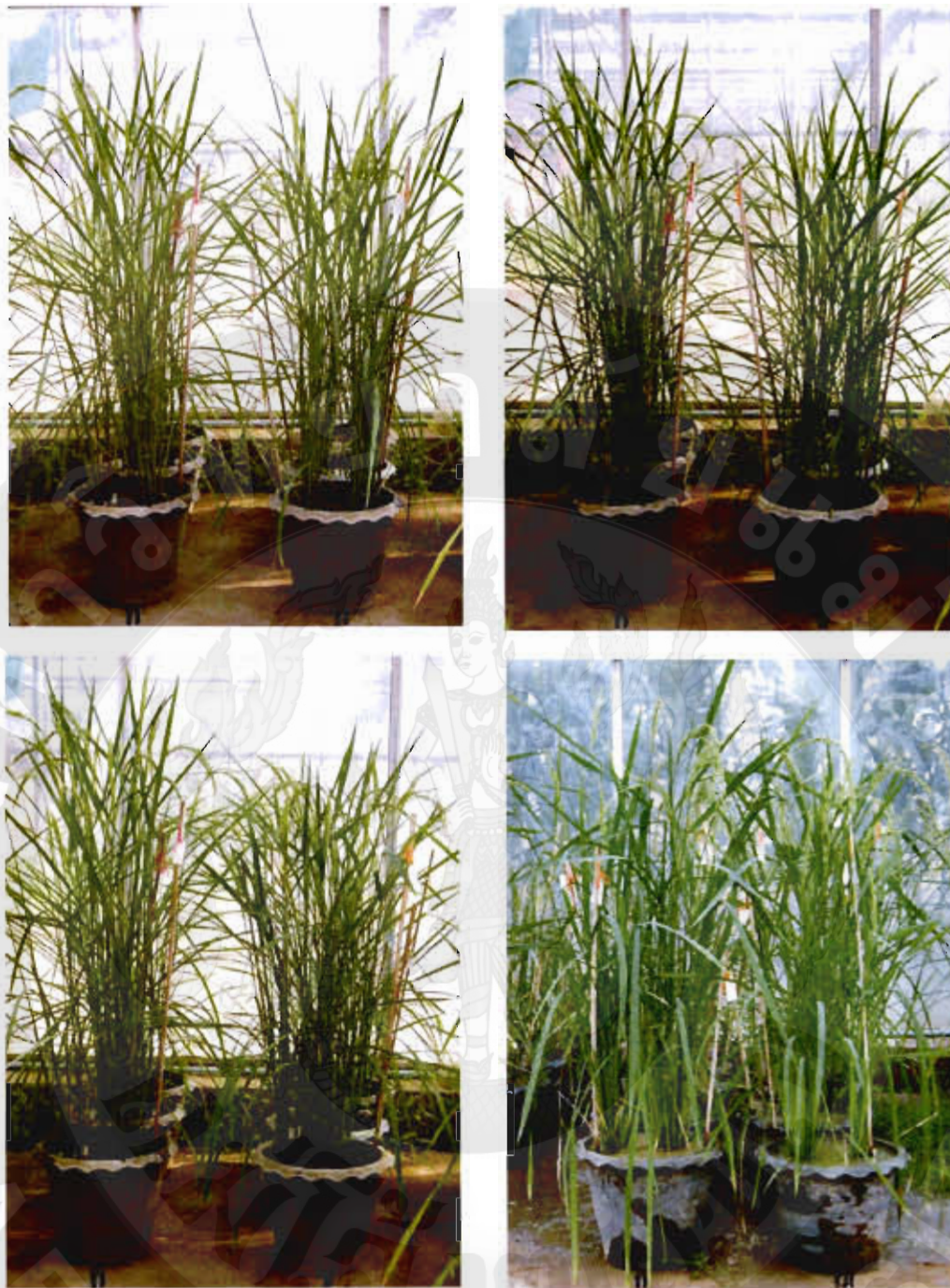
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตาราง 12 การเปรียบเทียบผลผลิตของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มขึ้น	จำนวนเมล็ดต่อรวง	น้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด
ต้นข้าวปกติ	-	-	126.67 ^{bcd}	2.16 ^b
pCAMBIA1303	pCAMBIA1303	<i>gusA</i> , <i>hptII</i>	114.11 ^{cd}	2.15 ^b
CS8-2-2	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> -TM	145.11 ^a	2.09 ^{bc}
CS8-2-16	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> -TM	133.78 ^{ab}	2.00 ^c
CS8-2-18	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> -TM	129 ^{bc}	2.06 ^c
CS8-3-1	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> -TM	116.56 ^d	2.30 ^a
CS8-3-2	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> -TM	107.22 ^e	2.35 ^a
CS8-4-13	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> -TM	79.56 ^f	2.24 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

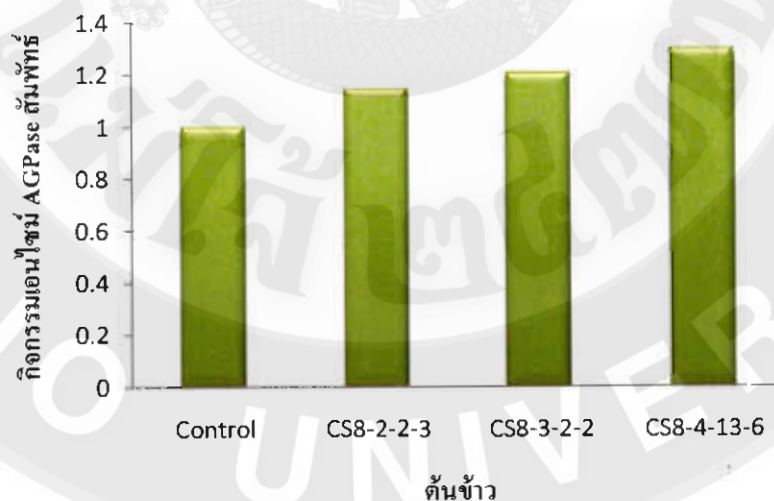




ภาพ 29 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ ก) ต้นข้าวปกติ ข) ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน pCAMBIA1303 ค) ต้นข้าว CS8-2-2 ง) ต้นข้าว CS8-2-8 จ) ต้นข้าว CS8-2-16 ฉ) ต้นข้าว CS8-2-18 ช) ต้นข้าวที่ CS8-3-1 ซ) ต้นข้าว CS8-3-2 ฌ) ต้นข้าว CS8-4-13

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในเมล็ดข้าว

จากต้นข้าวทั้ง 3 ต้น ที่คาดว่าจะน่าจะเป็น independent homozygous transgenic CS8 ซึ่งต้นข้าวมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับต้นข้าวปกติ และมีการแสดงออกของของเอนไซม์ AGPase ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน นำเมล็ดอ่อนข้าวระยะน้ำนม จากต้นข้าวรุ่น T_2 ทั้ง 3 ต้น ได้แก่ CS8-2-2-3, CS8-3-2-2, CS8-4-13-6 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ AGPase ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Nakamura et al. (1989) โดยเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ระหว่างต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมและต้นข้าวปกติ พบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมต้นที่ CS8-2-2-3, CS8-3-2-2, CS8-4-13-6 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า ต้นข้าวปกติ 1.15, 1.21 และ 1.30 เท่า ตามลำดับ (ภาพ 30) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sakulsingharoj et al. (2004) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC-TM* เข้าสู่ข้าวโดยให้ยีนแสดงออกในส่วนของไซโตพลาสซึม หลังตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในไซโตพลาสซึมเพิ่มขึ้นถึง 13 เท่า ในสภาวะที่มี 10 mM inorganic phosphate เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในต้นข้าวปกติ Smidansky et al. (2003) พบว่า หลังถ่ายยีน *Sh2r6hs* ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ AGPase จากข้าวโพดเข้าสู่ข้าว พบว่า สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ได้ 2.7 เท่า ในสภาวะที่มี 10 mM inorganic phosphate เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในต้นข้าวปกติ Wang et al. (2007) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC16* เข้าสู่ข้าวโพด พบว่าสามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ได้ 2-4 เท่า ในสภาวะที่มี 5 mM inorganic phosphate เมื่อเทียบกับต้นควบคุม และ Ihemere et al. (2006) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *glgC* เข้าสู่มันสำปะหลัง พบว่า สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ได้ 2.6 เท่า



ภาพ 30 กิจกรรมเอนไซม์ AGPase สัมพัทธ์ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_2 เทียบกับต้นข้าวปกติ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดในเมล็ดแก่ของข้าว

การศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณแป้งทั้งหมดจากเมล็ดข้าว Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ โดยได้ทำการปลูกข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1303 (ต้นข้าว 1303) รุ่น T₁ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCS8 (ต้นข้าว CS8) รุ่น T₂ และข้าว Sasanishiki ปกติที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน หลังจากวิเคราะห์จำนวนเมล็ดต่อรวง และน้ำหนักเมล็ด นำเมล็ดข้าวดังกล่าวมาวิเคราะห์แป้งทั้งหมดโดยใช้วิธี Glucoamylase method, AACC (1990) พบว่า ปริมาณแป้งทั้งหมดจากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ต้นที่ CS8-2-2-1 มีเปอร์เซ็นต์แป้งทั้งหมดสูงที่สุด 75.70 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือ CS8-4-13-5, CS8-3-2-2 และ 1303 มีเปอร์เซ็นต์แป้งทั้งหมด 73.51, 72.94, 72.43 ตามลำดับ (ตาราง 13) เมื่อเปรียบเทียบกับกับการทดลองของ Smidansky et al. (2003) ซึ่งพบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีกิจกรรมเอนไซม์ และน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณแป้งทั้งหมดไม่เพิ่มขึ้น

ตาราง 13 การเปรียบเทียบปริมาณแป้งทั้งหมดของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มขึ้น	เปอร์เซ็นต์แป้งทั้งหมด
ต้นข้าวปกติ	-	-	74.43 ^{ab}
pCAMBIA1303	pCAMBIA1303	<i>gusA</i> , <i>hptII</i>	72.43 ^b
CS8-2-2-1	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> - TM	75.70 ^a
CS8-3-2-2	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> - TM	72.94 ^b
CS8-4-13-5	pCS8	<i>gusA</i> , <i>hptII</i> , <i>glgC</i> - TM	73.51 ^{ab}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *glgC-TM* ซึ่งมีรหัสสำหรับเอนไซม์ AGPase กลายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูง สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *glgC-TM* ในจีโนมของข้าวพันธุ์ Sasanishiki ด้วยเทคนิค Southern blot พบว่า ต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ทั้ง 4 ต้น ที่นำมาวิเคราะห์ พบว่ามียีน *glgC-TM* แทรกอยู่ในจีโนม
2. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *glgC-TM* ที่ถ่ายเข้าสู่ข้าวและให้ยีนแสดงออกในส่วนเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีนระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าว และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน GlgC-TM ในเมล็ดแก่ของข้าว
3. การวิเคราะห์การถ่ายยีนไปสู่รุ่นลูก พบว่า ต้นข้าวรุ่น T₁ ต้นที่ CS8-2 และ CS8-4 มีการส่งถ่ายยีนไปสู่รุ่นลูก ซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่หนึ่งของเมนเดล คือ อัตราส่วนของต้นที่มียีน *glgC-TM* ต่อต้นที่ไม่มียีนเป็น 3:1 แสดงว่า ข้าวต้นที่ CS8-2 และ CS8-4 อาจมียีน *glgC-TM* แทรกในจีโนม 1 ตำแหน่ง (a single insertion site)
4. การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₂ กับต้นข้าวปกติ พบว่า ต้นข้าวปกติ ต้นข้าวควบคุม 1303 และ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม CS8 มีการเจริญเติบโตทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มยีนจากแบคทีเรียเข้าสู่จีโนมข้าวอาจไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นข้าว
5. การเปรียบเทียบผลผลิตของต้นข้าวพันธุ์ Sasanishiki ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₂ กับต้นข้าวปกติ พบว่า ต้นที่ CS8-3-1 CS8-3-2 และ CS8-4-13 มีน้ำหนักเมล็ดมากกว่าต้นข้าวปกติ ส่วนต้นที่ CS8-2-2 CS8-2-16 และ CS8-2-18 ถึงแม้ว่ามีน้ำหนักเมล็ดต่ำกว่าต้นปกติ แต่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าต้นปกติ

6. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในเมล็ดข้าว พบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมต้นที่ CS8-2-2-3, CS8-3-2-2, CS8-4-13-6 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า ต้นข้าวปกติ คิดเป็น 1.15, 1.21 และ 1.30 เท่า ตามลำดับ
7. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม พบว่า ต้นที่ CS8-2-2-1 มีเปอร์เซ็นต์แป้งทั้งหมดสูงที่สุด 75.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าต้นข้าวปกติ และต้นควบคุม 1303

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน *glgC-TM* จากแบคทีเรียเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Sasanishiki ทำให้ยีนมีการแสดงออกในเมล็ดข้าว สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ AGPase ในเมล็ด เพิ่มปริมาณแป้งทั้งหมดในเมล็ด และเพิ่มน้ำหนักเมล็ดข้าว ทำให้เพิ่มผลผลิตของข้าวได้

เอกสารอ้างอิง

- กล้านรงค์ ศรีวรรธ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. (2546). เทคโนโลยีของแป้ง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- จันทนา สรสิริ; เล็ก จันทรเกษม; สารนิติ สงวนสัง; เคนศักดิ์ หาดรงจิตต์ และ สถาพร กาญจนพันธุ์. (2539). ศึกษาหาวิธีการปลูกข้าวญี่ปุ่น. น. 326-335. ใน: ฐานข้อมูลความรู้เกษตรกรไทย. สำนักพิมพ์ กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยข้าว ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก.
- ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์, วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง พงษ์เจริญกิต และ นลินี รุ่งเรืองศรี. (2554). การปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์แป้งในข้าวเพื่อเพิ่มน้ำหนักรีดและผลผลิต. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). 73 น.
- ปิยะ กิจถาวร. 2551. พืชไฟโตส่งผลให้เกิดนาร้างร่วม 6 แสนไร่ใน 3 จชต. ผู้จัดการรายวัน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.manager.co.th/Daily/ViewNews.aspx?NewsID=9510000004889> (2 กุมภาพันธ์ 2554).
- แผนงานฐานทรัพยากรอาหาร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.). (2552). [ระบบออนไลน์] <http://www.zoisandsook.com/viewtopic.php?id=6096> (2 กุมภาพันธ์ 2554).
- พิเชียร คุระทอง. (2546). ผ่าพืชแปลงพันธุ์. สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพฯ. 232 น.
- พูนศรี อินตะ. (2553). การถ่ายยีนสร้างเอนไซม์เอดีพี-กลูโคสไพโรฟอสฟอริเลสเข้าสู่ข้าว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 85 น.
- สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร (2543). ข้าว: ชีวิต เศรษฐกิจ และ สิ่งแวดล้อม.การประชุมวิชาการประจำปี 2543 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 104 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2550). สถิติการเกษตรของประเทศไทย 2550. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50>, 16 กันยายน 2550.
- Baker J. T., Allen L. H. and Boote K. J. (1990). Growth and yield responses of rice to carbon dioxide concentration. J Agricul Sci. 115 : 313-320.
- Chen C. L., Li C. C. and Sung J. M. (1994). Carbohydrate metabolism enzymes in CO₂-enriched developing rice grains varying in grain size. Physiol Plant. 90 : 79-85.
- Datta S.K. (2004). Rice Biotechnology : A Need for Developing Countries. AgBioForum. 7(1&2) : 31-35.

- Hwang, S.K. and Y.M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. *J. Biochem. Mo. Biol* 33(6): 537-546.
- Hiei, Y., S. Ohta. and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282.
- Hiei,Y. and Komari,T. 2006. Improved protocols for transformation of *indica* rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell Tissue Organ Culture* 85:271-283.
- Ho L.C. (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 39 : 355-378.
- Ihemere U., Arias- Garzon D., Lawrence S. and Sayre R. (2006). Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnology Journal.* 4 : 453-465.
- Imai K., Coleman D. and Yanagisawa T. (1985). Increase of atmospheric partial pressure of carbon dioxide and growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Japan J. Crop Sci.* 54 : 413-418.
- Juliano B.O. (1972). The rice caryopsis and its composition. In DF Houston, ed, *Rice: Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, pp. 16-74.
- Leung P. S. C. and Preiss J. (1987). Cloning of the ADPglucose pyrophosphorylase (*glgC*) and glycogen synthase (*glgA*) structural genes from *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 169 : 4349-4354.
- Nakamura, Y., K. Yuki, S.-Y. Park and T. Ohya. (1989). Carbohydrate Metabolism in the Developing Endosperm of Rice Grains. *Plant Cell Physiol* 30: 833-839.
- Okita T. W., Rodriguez R. L. and Preiss J. (1981). Biosynthesis of bacterial glycogen: cloning of the glycogen biosynthetic structural genes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256 : 6944-6952.
- Okita T. W., Sun .J, Sakulsingharoj C., Choi S-B., Edwards G. E., Kato C., Ito H. and Matsui H. (2001). Increasing rice productivity and yield by manipulation of starch synthesis. In JA Goode, D Chadwick, eds, *Rice Biotechnology: Improving Yield,*

- Stress Tolerance and Grain Quality, Novartis Foundation Symposium 236. John Wiley and Sons, New York, pp. 135-152.
- Preiss J. and Romeo T. (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. In WE Cohn, K Moldave, eds, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 47. Academic Press Inc., San Diego, pp. 299-329.
- Rowland-Bamford A. J., Jr L. H. A., Baker J. T. and Boote K.J. (1990). Carbon dioxide effects on carbohydrate status and partitioning in rice. *Plant Cell Environ.* 14 : 1601-1608.
- Sakulsingharoj C., Choi S-B., Hwang S-K., Edwards G.E., Bork J., Meyer C.R., Preiss J., Okita T.W. (2004). Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: The role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 167: 1323-1333.
- Smidansky, E., J. Martin, I. Fischer and M. Giroux. (2003). Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 216: 656 – 664.
- Sikka V. K., Choi S-B., I.H. Kavakli I. H., Sakulsingharoj C., Gupta S., Ito H. and Okita T. W. (2001). Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Sci.* 161 : 461-468.
- Stark D. M., Timmerman K. P., Barry G. F., Preiss J. and Kishore G. M. (1992). Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science.* 258 : 287-292.
- Toki, S. 1997. Rapid and efficient. *Agrobacterium* – mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology* 15(1) : 16-21.
- Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S. and Tannaka, H. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant Journal.* 47, 969-976.
- Wang Z., Chen X., J. Wang J., Liu T., Liu Y., Zhao L. and Wang G. (2007). Increasing maize seed weight by enhancing the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in transgenic maize plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 88 : 83-92.