

การศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง  
ในข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

ณิชนน ธรรมรักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การศึกษากายถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง

ในข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

โดย

นิชมน ธรรมรักษ์

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

*ชอทิพา สกุดสิงหาโรจน์*  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชอทิพา สกุดสิงหาโรจน์)

วันที่ 2 เดือน 5.0 พ.ศ. 2551

กรรมการที่ปรึกษา

*แสงทอง พงษ์เจริญกิต*  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่ 2 เดือน 5.0 พ.ศ. 2551

กรรมการที่ปรึกษา

*รัฐพร จันทร์เดช*  
(อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช)

วันที่ 2 เดือน 5.0 พ.ศ. 2551

กรรมการที่ปรึกษา

*อุบลศรี เลิศสกุลพาณิชย์*  
(อาจารย์ ดร.อุบลศรี เลิศสกุลพาณิชย์)

วันที่ 2 เดือน 5.0 พ.ศ. 2551

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

*พริกานต์ บรรณกิจ*  
(อาจารย์ ดร.พริกานต์ บรรณกิจ)

วันที่ 3 เดือน 5.0 พ.ศ. 2551

สำนักงานบัณฑิตศึกษารับรองแล้ว

*เทพ พงษ์พานิช*

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 4 เดือน 5.0 พ.ศ. 2551

ชื่อเรื่อง	การศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้ง ในข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6
ชื่อผู้เขียน	นางสาวณิชนน ธรรมรักษ์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

### บทคัดย่อ

การทดลองนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) จากผึ้งโพรง (*Apis cerana indica*) ของไทย ในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าว เพื่อพัฒนาข้าวตัดแปลงพันธุกรรมให้เป็นต้นแบบในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพของผลผลิต โดยได้สร้างพลาสมิด pNT5 ขนาด 14,633 คู่เบส ซึ่งมีชุดยีน *mrjp2* ที่ควบคุมการทำงานโดย 35S dual enhancer promoter, TEV leader และ 35S terminator (E35S:: TEV leader:: *mrjp2*:: T35S) แทรกอยู่บริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ของพลาสมิด pCAMBIA1305.2 สำหรับใช้ถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่ข้าว

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ดัดแปลง ซึ่งมีฮอร์โมน 2, 4 - D (2, 4 - Dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 4 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และที่มืด ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดต้นด้วยอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมฮอร์โมน NAA และไคเนติน เข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งได้ดัดแปลงระบบการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมของข้าวพันธุ์ Kitaake ซึ่งมีการศึกษาและใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 (pNT5) พบว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ แต่แคลลัสที่ได้รับยีนไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ ส่วนแคลลัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับยีนสามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ โดยเกิดต้นข้าวร้อยละ 43.33 ซึ่งมียีนโปรตีนนมผึ้งแทรกอยู่ในจีโนม และได้ต้นข้าวที่มีการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในระดับ mRNA ร้อยละ 36.67 แต่ไม่สามารถตรวจการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฐานวิทย์ของข้าวพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T<sub>0</sub> กับข้าวปกติ พบว่า

ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูงกว่าข้าวปกติ แสดงว่า ระบบการถ่ายยีนของ Toki (1997) เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวชนิดจาปอนิกาได้ด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไปได้ แต่ไม่เหมาะสมกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ซึ่งเป็นข้าวชนิดอินดิกา



<b>Title</b>	A study on transformation and expression of Major Royal Jelly Protein gene in <i>japonica</i> rice cv. Kitaake and <i>indica</i> rice cv. RD 6
<b>Author</b>	Miss Nitchamon Thamaragsa
<b>Degree of</b>	Master of Science in Biotechnology
<b>Advisory Committee Chairperson</b>	Assistant Professor Dr.Chotipa Sakulsingharoj

### ABSTRACT

Transformation and expression of major royal jelly protein (*mrjp2*) gene in glutinous rice (*Oryza sativa* sp.) cv. RD 6 were studied. The aim of this study was to transform a major royal jelly protein gene (*mrjp2*) into rice and to express this gene in transgenic rice for increased seed protein content and quality improvement. The plasmid using for plant transformation, pNT5 (14,633 bp), was constructed. The *mrjp2* gene cassette driven by 35S CaMV dual enhancer promoter was inserted into *Pst*I recognition site of a binary vector, pCAMBIA 1305.2.

Callus induction of *indica* Thai glutinous rice cv. RD 6 and *japonica* rice cv. Kitaake were studied using N6 medium supplemented with 4 and 2 mg/L 2, 4 – D, respectively. The calli of two varieties were induced under 16 h – light and dark conditions, respectively. Both of calli were regenerated on MS media supplemented with 1.0 mg/L NAA and 2.5 mg/L kinetin. Transformation of a major royal jelly protein (*mrjp2*) gene was modified from *Agrobacterium* – mediated transformation system of *japonica* rice (Kitaake) that has been established and widely used in several laboratories. The calli of two rice varieties were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 harboring the binary vector, pNT5. The results showed that the genes were successfully transformed into the calli of both rice varieties. However, the transformed RD 6 calli were unable to produce plantlets. The regeneration efficiency of the transformed Kitaake calli was 43.33 percentage of plants with stable integration of *mrjp2* gene in the plant genome. The 36.67 percent of transgenic rice plants showed the *mrjp2* expression at mRNA level. Expression of MRJP2 protein in selected transgenic lines, however, was not detected by Western blot technique using anti –

His antibody. Comparison of transgenic ( $T_0$ ) and untransformed Kitaake rice plants was studied. The results indicated that all Kitaake rice plants showed no significant differences in morphology and growth while seed protein content of most transgenic rice was significantly higher than that of untransformed rice. Overall results indicated that the transformation system of Toki (1997) was effective for Kitaake rice transformation and suitable for *japonica* rice improvement using genetic engineering. But, this system was not suitable for RD 6 rice, *indica* rice.



## กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง “การศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6” เพื่อประกอบการศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต อาจารย์ ดร.รัฐพร จันทร์เดช และอาจารย์ ดร.อุบลศรี เลิศสกุลพานิช กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณอย่างยิ่งกับการดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี อีกทั้งขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นลินี รุ่งเรืองศรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ผู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รองศาสตราจารย์ ดร.นพมณี โทบุญญานนท์ รองศาสตราจารย์ ประวิตร พุทยานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปวีณา ภูมิสุทธาผล ที่ให้คำแนะนำเพิ่มเติม ตลอดจนความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ทำให้งานทดลองสำเร็จได้ด้วยดี

นอกจากนี้ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด pRTL 2 และเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด pCAMBIA 1305.2

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยระดับปริญญาโท ในงบประมาณปี 2550 และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาการศึกษาต่าง ๆ อีกทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการทำงาน ตลอดจนนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาตรีสาขา

เทคโนโลยีชีวภาพทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน และเป็นกำลังใจจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เหนือสิ่งอื่นใดขอขอบพระคุณ บิดา มารดา น้องชาย และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้การสนับสนุนทั้งทางด้านกำลังใจ และสนับสนุนค่าใช้จ่ายระหว่างการศึกษา ตลอดจนความรักความห่วงใยที่มีให้ตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คุณความดีและผลของสิ่งดีดีที่เกิดขึ้นจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบให้แก่ บิดา มารดา ครูบาอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน สุดท่ายนี้ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจไม่มากนัก

ณิชนน ธรรมรักษ์

12 พฤษภาคม 2551



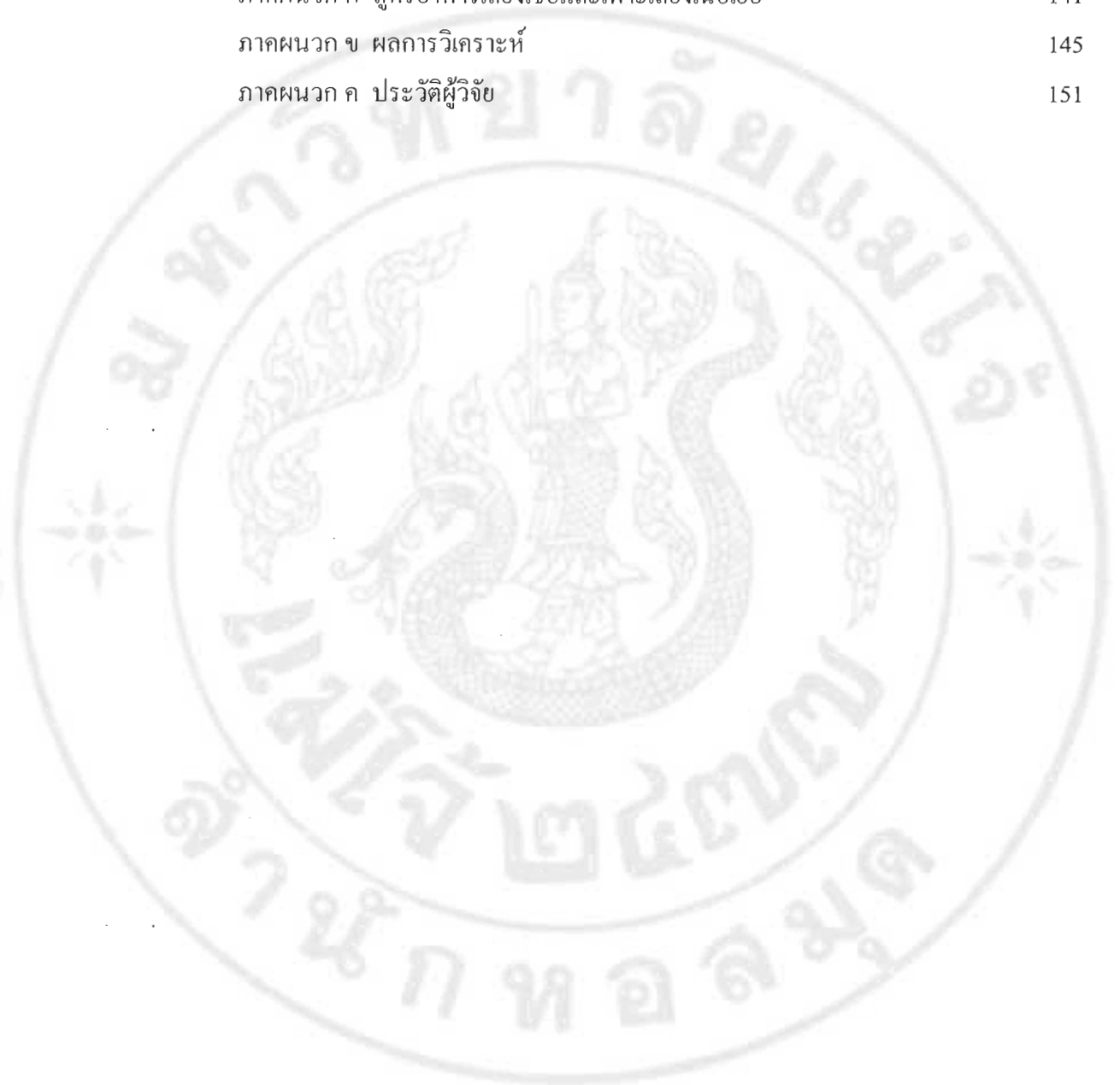


## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(9)
สารบัญตาราง	(12)
สารบัญภาพ	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ความสำคัญของข้าว	3
ชีววิทยาของข้าว	3
การเจริญเติบโตของข้าว	4
องค์ประกอบของเมล็ดข้าว	7
ปัญหาการขาดโปรตีนในประเทศไทย	9
โปรตีนนมผึ้ง (Major Royal Jelly Protein: MRJP)	9
ยีน โปรตีนนมผึ้ง (major royal jelly protein gene: <i>mrjp2</i> )	10
การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม	11
การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย	13
การศึกษาการถ่ายยีนในพืชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย	14
ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย	18
กรอบแนวความคิด	22
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	23
พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง	23
เชื้อที่ใช้ในการทดลอง	23

พลาสติกที่ใช้ในการทดลอง	23
วัสดุและอุปกรณ์	24
เครื่องมือ	24
สารเคมีและน้ำยาทดสอบ	25
ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit)	28
ดีเอ็นเอและ โปรตีนมาตรฐาน (DNA and Protein Marker)	28
เอนไซม์	29
ไพรเมอร์ (Primer)	29
อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเชื้อแบคทีเรีย	30
วิธีการทดลอง	30
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	32
วิธีการดำเนินงาน	32
สถานที่ดำเนินการวิจัย	36
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	36
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	37
การสร้างชุดยีน <i>mrjp2</i> สำหรับใช้ในการถ่ายยีนในข้าว	38
การเพาะเลี้ยงแคลลัสและชักนำให้เกิดต้น	68
การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าว	72
การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase	83
การวิเคราะห์ยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าวตัดแปลงพันธุกรรม	87
โดยเทคนิคซีวโมเลกุล	
การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวญี่ปุ่น พันธุ์ Kitaake	112
ตัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ	
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	128
สรุปผลการทดลอง	128
ข้อเสนอแนะ	129
เอกสารอ้างอิง	130

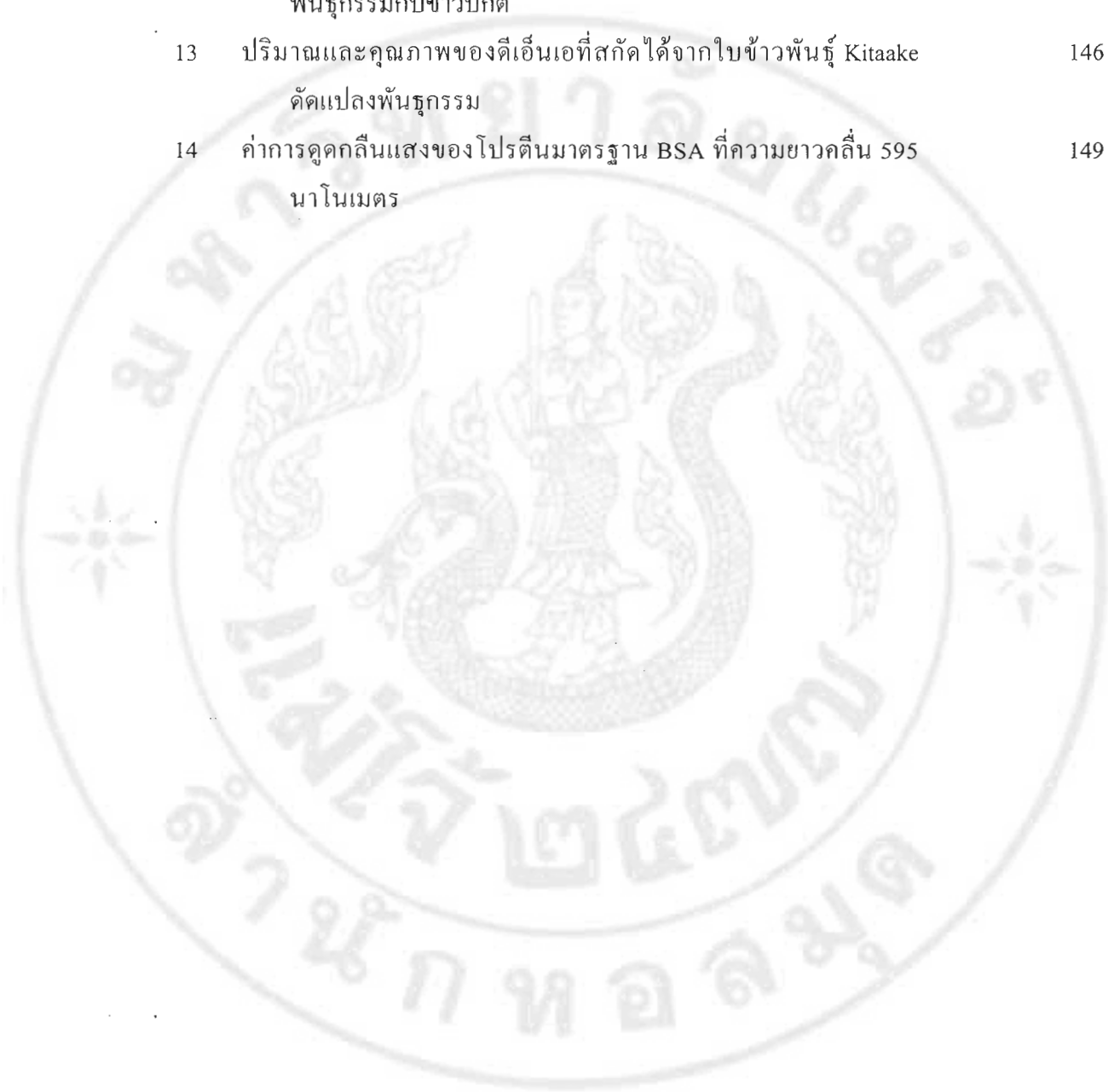
ภาคผนวก	139
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อ	141
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์	145
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย	151



## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ร้อยละของการเกิดแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N6 ดัดแปลงซึ่งมีการเติมฮอร์โมน 2, 4 - D	69
2 ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน หลังการคัดเลือกครั้งที่ 1	73
3 ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน หลังการคัดเลือกครั้งที่ 2	74
4 ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 1	77
5 ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 2	78
6 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase ของต้นข้าว ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค GUS assay	85
7 สรุปผลการตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งในจีโนมข้าวพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์	92
8 สรุปผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง ( <i>mrjp2</i> ) ใน ข้าว Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน <i>mrjp2</i> แทรกอยู่ในจีโนม ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล	107
9 สรุปผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase ( <i>gusA</i> ) ในข้าว Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน <i>mrjp2</i> แทรกอยู่ในจีโนมด้วยเทคนิค Western blot	108
10 สรุปผลการตรวจสอบข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิคชีวโมเลกุล	109
11 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าว Kitaake ดัดแปลง พันธุกรรมกับข้าวปกติ	114

12	การเปรียบเทียบผลผลิตและปริมาณโปรตีนของข้าว Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	122
13	ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรม	146
14	ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	149



## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ข้าวที่งอกจากเมล็ด	5
2 ข้าวที่แตกกอ	6
3 โครงสร้างของเมล็ดข้าว	8
4 โครงสร้างของยีน <i>mrjp2</i> จากฝั่งโพรงของไทย ( <i>Apis cerana</i> )	11
5 แผนที่พลาสมิด pET_ <i>mrjp2</i>	37
6 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2	38
7 การประมาณความเข้มข้นของพลาสมิด pET_ <i>mrjp2</i> เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน MassRuler™ DNA Ladder, High Range	39
8 การหาปริมาณความเข้มข้นของ MgSO <sub>4</sub> ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน <i>mrjp2</i> จากพลาสมิด pET_ <i>mrjp2</i> โดยวิธีพีซีอาร์	40
9 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>mrjp2</i> ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit	41
10 ผลการตัดยีน <i>mrjp2</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NcoI</i> และ <i>SacI</i>	42
11 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอของยีน <i>mrjp2</i> ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NcoI</i> และ <i>SacI</i> โดยใช้ QIAquick gel extraction kit	42
12 แผนที่พลาสมิด pNT1	43
13 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิด pNT1 ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2	44
14 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NcoI</i> และ <i>SacI</i> เปรียบเทียบกับพลาสมิด pRTL2	45
15 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i>	46

ภาพ	หน้า
16 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> และ <i>SacI</i>	47
17 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NcoI</i> แล้วดึงหมู่ฟอสเฟตออกด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase และผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit	48
18 แผนที่พลาสมิด pNT2	49
19 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิด pNT2 ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดจากโคโลนีแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีพลาสมิด pNT1	50
20 การเข้าเชื่อมกันของยีน <i>mrjp2</i> ขนาด 528 คู่เบสในพลาสมิด pNT2	51
21 การตรวจสอบพลาสมิด pNT2 ที่สกัดได้จากทั้ง 23 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NcoI</i>	53
22 การตรวจสอบพลาสมิด pNT2 ที่สกัดได้จากทั้ง 23 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>ClaI</i> และ <i>SacI</i>	54
23 Contig ของยีน <i>mrjp2</i>	56
24 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>mrjp2</i> (Accession no. AF525777) ในฐานข้อมูลของ GeneBank กับ Contig ของยีน <i>mrjp2</i> ในพลาสมิด pNT2	57
25 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสมาจากยีน <i>mrjp2</i> (Accession no. AF525777) ในฐานข้อมูลของ GeneBank กับ Contig ของยีน <i>mrjp2</i> ในพลาสมิด pNT2 ด้วยโปรแกรม ClustalX	58
26 แผนที่พลาสมิด pNT5	59
27 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิด pNT5 ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดโคโลนีแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2	60

ภาพ	หน้า	
28	แผนที่พลาสมิด pNT5 ทั้ง 2 แบบ	61
29	การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 ที่สกัดได้จากทั้ง 8 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Pst</i> I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.2	62
30	การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 ที่สกัดได้จากทั้ง 8 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I และ <i>Sac</i> I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.2	63
31	การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 และ 20 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.2	64
32	การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 และ 20 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I กับ <i>Sac</i> I, <i>Nco</i> I และ <i>Nco</i> I กับ <i>Pst</i> I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.2	65
33	พลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ไม่ได้ถ่ายฝากพลาสมิด และได้รับพลาสมิด pNT5	67
34	การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 ในเซลล์อะโกรแบคทีเรีย โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I และ <i>Sac</i> I เปรียบเทียบกับพลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ไม่ได้ถ่ายฝากพลาสมิด	68
35	ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N6 ซึ่งเติมฮอร์โมน 2, 4 – D เข้มข้น 4 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเป็นเวลา 4 สัปดาห์	70
36	ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน NAA และ Kinetin เข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ	71
37	ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 3 วัน	72



- 39 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ครั้งที่ 2 ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 75
- 40 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 1 ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 79
- 41 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 2 ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 80
- 42 ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรม หลังถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 (ก) และ pNT5 (ข) ที่กระตุ้นให้เกิดรากในอาหารซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 81
- 43 ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมที่นำออกปลูกลงในดิน หลังการกระตุ้นให้เกิดรากในอาหารซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 82
- 44 ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกในโรงเรือน 82
- 45 การแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค GUS assay ในต้นข้าวคัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1305.2 และ pNT5 84
- 46 การตรวจสอบแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hptII*) 88
- 47 การตรวจสอบแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) 89
- 48 การตรวจสอบต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) 91
- 49 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ในระดับ mRNA ในใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT - PCR 95

ภาพ	หน้า
50 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง ( <i>mrjp2</i> ) ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค RT - PCR	96
51 การตรวจสอบโปรตีนในใบของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค SDS – PAGE	98
52 การตรวจสอบโปรตีนในใบของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค Western blot	99
53 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค SDS – PAGE	101
54 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค Western blot	102
55 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดแก่ของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค SDS – PAGE	105
56 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดแก่ของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค Western blot	106
57 การปลูกต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมพันธุ์ Kitaake รุ่น T <sub>0</sub> เปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ	113
58 การเปรียบเทียบความสูงของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	117
59 การเปรียบเทียบจำนวนกอกของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	118
60 การเปรียบเทียบวันออกดอกของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	119
61 การเปรียบเทียบจำนวนช่อดอกของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	120
62 การเปรียบเทียบจำนวนรวงของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	121
63 การเปรียบเทียบจำนวนเมล็ดของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	125
64 การเปรียบเทียบน้ำหนักเมล็ดของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	126
65 การเปรียบเทียบปริมาณ โปรตีน ในเมล็ดของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ	127
66 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรม	148

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญของปัญหา

การปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถควบคุมลักษณะที่ต้องการได้ โดยใช้ระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของประชากรโลก ซึ่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชีย ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวซึ่งมีการผลิตข้าวโดยรวมคิดเป็น 25.763 ล้านตันข้าวเปลือก โดยเฉพาะข้าวซึ่งมีการส่งออกในรูปของข้าวสาร คิดเป็นมูลค่าประมาณ 6 – 8 หมื่นล้านบาท (อรอนงค์, 2547) โดยข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรว่า มีคุณสมบัติทนแล้ง มีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม และต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล โรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และแมลงบั่ว โดยได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพาะปลูกในทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งมีพื้นที่โดยรวมจำนวน 14,862,082 ไร่ และมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ประมาณ 348 กิโลกรัมต่อไร่ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวต่างประเทศ, 2551)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของเมล็ดข้าวแล้ว พบว่า มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้ง ประมาณร้อยละ 80 – 90 และโปรตีน ประมาณร้อยละ 6 – 7 โดยพบว่าไลซีน และทรีโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นของร่างกายมีปริมาณต่ำ ดังนั้นการเพิ่มคุณค่าของข้าว โดยการเพิ่มปริมาณโปรตีนในข้าวจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจและส่งเสริมสุขภาพประชากร

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนในนมผึ้ง ซึ่งสร้างขึ้นโดยผึ้งพยาบาล (nurse bee) พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ MRJP หรือ Major Royal Jelly Protein และจากการศึกษาวิจัยของ Imjongirak et al. (2005) ซึ่งทำการแสดงออกของยีน *mrjp1* และ *mrjp2* จากผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*) ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* พบว่า โปรตีนที่แสดงออกโดยยีนทั้ง 2 มีกรดอะมิโนจำเป็นทั้ง 10 ชนิดในปริมาณที่สูงมากประมาณร้อยละ 48.5 และ 45.4 ตามลำดับ ดังนั้น การสร้างโปรตีนดังกล่าวในข้าวก็จะเป็นการเพิ่มคุณค่าทางหนึ่ง แต่การถ่ายโอนยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าไปสู่ข้าว จำเป็นต้องมีวิธีการและสภาวะที่เหมาะสม จึงจะประสบความสำเร็จได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษารายยีน *mrjp2* เข้าไปในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยมีการทำงานภายใต้การควบคุมของ 35S double promoter ซึ่งต่อกับ TEV leader sequence ซึ่งจะทำ

ให้มีการแสดงออกอย่างมากตลอดเวลา และไม่จำเพาะต่อชนิดของเนื้อเยื่อพืช โดยคาดว่าจะเพิ่มปริมาณ และคุณภาพของโปรตีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างชุดยีน โปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) สำหรับใช้ในการถ่ายยีนในข้าว
2. เพื่อศึกษาการถ่ายยีน *mrjp2* จากฝัองโพรงในข้าว
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *mrjp2* จากฝัองโพรงในข้าว

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสร้างองค์ความรู้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น
2. สามารถถ่ายยีน *mrjp2* จากฝัองโพรงของไทยเข้าสู่ข้าวซึ่งสามารถมีการแสดงออกของยีนให้มีปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ดสูงขึ้น
3. เพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวคัดแปลงพันธุกรรมที่จะสามารถเป็นต้นแบบในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### ความสำคัญของข้าว

ข้าว นับเป็นอาหารหลักของประชากรส่วนใหญ่ในโลก และมีปริมาณการบริโภคเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยข้าว นับเป็นสินค้าออกที่สำคัญของประเทศไทย และอีกหลายประเทศในเอเชีย ทั้งนี้ยังได้มีพื้นที่การเพาะปลูกในปี 2002 – 2004 ร้อยละ 6.3 – 6.9 ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวในต่างประเทศได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เหตุผลหนึ่งที่ทำให้ให้นักวิจัยทั่วโลกให้ความสำคัญกับข้าวในการที่จะคัดเลือกพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ข้าวที่ให้ผลผลิตมากที่สุด อุดมด้วยวิตามิน นุ่มหอม ต้านทาน โรคพืช (พิเชียร, 2546) ในขณะเดียวกัน การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับข้าวภายในประเทศไทย ก็กำลังได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากข้าวมีจีโนมขนาดเล็ก มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง และมีระบบการถ่ายยีนที่ได้รับการพัฒนาแล้ว (อภิชาติ, 2540) ซึ่งในปัจจุบันหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว สามารถค้นพบยีนในข้าวที่เป็นประโยชน์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านทานต่าง ๆ ยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการทนต่อน้ำท่วม และคุณสมบัติความหอม เป็นต้น โดยความรู้เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สำคัญได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาและศึกษาในระดับโมเลกุลของธัญพืชอื่น ๆ ได้ (มรกต และศิริพร, 2547)

#### ชีววิทยาของข้าว

ข้าว เป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในกลุ่มของพืชตระกูลหญ้า (Family Gramineae) สกุลออไรซา (*Oryza*) ซึ่งข้าวที่ปลูกเพื่อบริโภคมี 2 ชนิด คือ ข้าวเอเชีย หรือ (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) จัดเป็นพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก โดยมีขนาดเล็กกว่าข้าวโพด และข้าวสาลี 16 และ 40 เท่า ตามลำดับ ข้าวประกอบด้วยสารพันธุกรรมประมาณ 4.3 ล้านคู่เบส มีโครโมโซม 12 คู่ ( $2n = 24$ ) (อภิชาติ, 2540; Shimamoto, 1995) การเกิดวิวัฒนาการของข้าวทำให้เกิดการพัฒนาพันธุ์ใหม่ เพื่อปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศวิทยาที่ขึ้นอยู่ และมีผลทำให้มีการ

ปรับเปลี่ยนของรูปพรรณสัณฐานและสรีรวิทยา โดยสามารถจัดแบ่งข้าวออกได้ เป็น 3 subspecies ด้วยกัน ได้แก่ ข้าวอินดิกา จาปอนิกา และจาวานิกา (สุรางค์ศรี, 2537)

### การเจริญเติบโตของข้าว

การเจริญเติบโตของข้าวสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ระยะการเจริญทางการสืบพันธุ์ และระยะการเจริญทางด้านเมล็ด ซึ่งจะมีกระบวนการและลำดับขั้นตอนในการเจริญเติบโตที่แน่นอน (จำรัส, 2534)

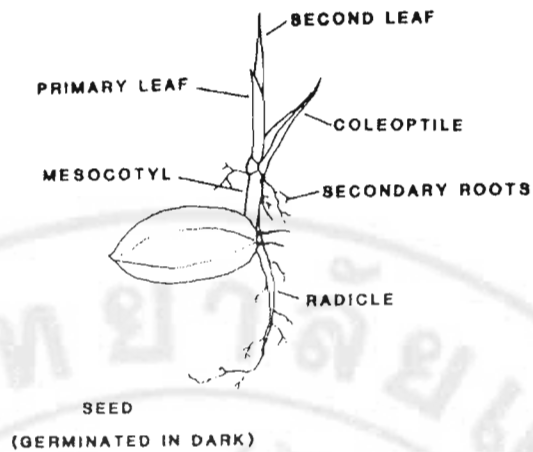
#### 1. ระยะการเจริญทางลำต้นและใบ

ในระยะนี้เป็นการเจริญเติบโต โดยเริ่มตั้งแต่การงอกของเมล็ดจนกระทั่งระยะก่อนเกิดช่อดอก โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย ได้แก่

##### 1.1. ระยะกล้า

ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ต้นข้าวงอกออกจากเมล็ดจนเริ่มแตกกอ โดยรากรุ่นแรกจะงอกออกจากเมล็ดทางงอกข้าว หรือเอ็มบริโอ (embryo) หลังจากนั้นจะเกิดยอดอ่อนในด้านตรงกันข้าม และเมื่ออายุได้ประมาณ 14 วัน จะมีรากใหม่งอกออกมาจากโคนต้น จนอายุได้ประมาณ 25 – 30 วัน รากแรกที่เกิดจะหลุดออกไป

ส่วนของลำต้นที่งอกออกจากเอ็มบริโอจะมีส่วนที่เรียกว่า ปลายกุ่มยอดอ่อน (coleoptile) หุ้มไว้ โดยจะเห็นใบแรก (primary leaf) โผล่ออกมาหลังจากเกิดยอดอ่อนได้ประมาณ 3 วัน (ภาพ 1) และหลังจากนั้น 5 – 10 วัน จะเกิดใบที่ 2 และ 3 ตามมา และเมื่อเกิดใบที่ 4 อาหารสะสมในเมล็ดจะหมดลง ทำให้ต้องใช้รากในการดูดสารอาหารจากในดิน เมื่อดันอ่อนมีความสูงประมาณ 20 – 30 เซนติเมตร จะเรียกว่าต้นกล้า หรือกล้าข้าว ซึ่งจะเข้าระยะการแตกกอ จึงนิยมนำไปปักดำต่อไป

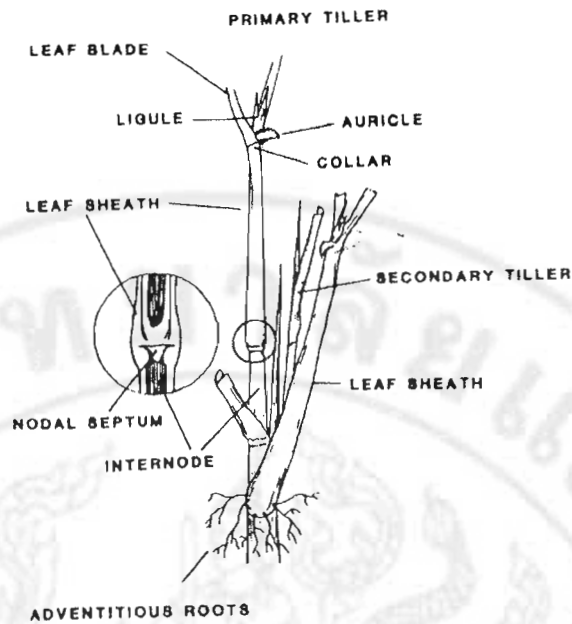


ภาพ 1 ข้าวที่งอกจากเมล็ด

ที่มา: Webster and Gunnell, 1992

#### 1.2. ระยะแตกกอ

ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มแตกกอจนเริ่มสร้างดอกอ่อน โดยทั่วไปแล้วข้าวจะเริ่มแตกกอหลังจากการปักดำได้ 7 – 10 วัน หรืออายุประมาณ 30 – 40 วัน โดยจะสังเกตเห็นแขนงของต้นข้าวที่งอกออกมาจากต้นเดิม (ภาพ 2) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และสภาพแวดล้อม โดยปกติข้าวที่ให้ผลผลิตในปริมาณมากจะเป็นข้าวที่แตกกอได้มาก และเร็ว ซึ่งปกติใช้ระยะเวลาประมาณ 30 – 50 วัน หลังระยะกล้า แล้วจึงเริ่มออกดอก แต่ถ้าเป็นข้าวไวแสงจะต้องรอให้ได้รับช่วงแสงที่เหมาะสมเสียก่อน



ภาพ 2 ข้าวที่แตกกอ

ที่มา: Webster and Gunnell, 1992

## 2. ระยะการเจริญทางการสืบพันธุ์

ในระยะนี้เริ่มตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มสร้างช่อดอกอ่อน ตั้งท้อง ออกดอก และผสมพันธุ์ ใช้เวลาโดยประมาณ 30 – 35 วัน โดยสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

### 2.1. ระยะเริ่มสร้างช่อดอกอ่อน

เมื่อต้นข้าวอยู่ในสภาพที่พร้อมจะสร้างรวงอ่อน ได้รับปัจจัยที่เหมาะสมในการกระตุ้น จะทำให้สร้างรวงอ่อน โดยต้นข้าวจะเปลี่ยนจากต้นแบนเป็นต้นกลม และภายในส่วนปลายยอดสุดของต้นข้าวจะเกิดช่อดอก มีลักษณะเป็นปุ่มเล็ก ๆ ซึ่งจะพัฒนาเป็นช่อดอกใหญ่ต่อไป

### 2.2. ระยะตั้งท้อง

ระยะนี้ช่อดอกอ่อนจะเกิดการพัฒนามาเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์ ซึ่งจะเห็นกาบใบของใบสุดท้ายที่เรียกว่าใบธง จะเกิดการพองกลมใหญ่กว่าส่วนล่างของลำต้น เรียกว่าข้าวตั้งท้อง โดยในช่วงนี้ต้องการสารอาหารมากเป็นพิเศษ

### 2.3. ระยะออกดอกและผสมพันธุ์

เมื่อข้าวตั้งท้องเต็มที่แล้วช่อดอกจะเริ่มโผล่พ้นกาบใบธงออกมา จากนั้นดอกข้าวจะเริ่มบานจากปลายช่อดอกมาจนถึงโคนรวง ใช้เวลาประมาณ 6 – 7 วัน ซึ่งการบานของดอกข้าวจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น และลักษณะประจำพันธุ์อีกด้วย โดยดอกข้าวจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ



คือมีเกสรตัวผู้และตัวเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน จึงมักเกิดการผสมเกสรภายในต้นเดียวกัน (self – pollination)

### 3. ระยะเวลาเจริญทางด้านเมล็ด

หลังเกิดการปฏิสนธิของข้าวแล้วประมาณ 7 – 10 วัน ข้าวจะอยู่ในระยะน้ำนม (milky stage) ภายในจะมีลักษณะเป็นน้ำแป้งสีขาวเมื่อปล่อยให้ 7 – 10 วันจะเกิดการเกาะตัวเป็นก้อนนุ่ม ๆ แล้วจะแข็งตัวในที่สุด ซึ่งใช้ระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 30 – 35 วัน ข้าวจะสุกพร้อมเก็บเกี่ยวได้

## องค์ประกอบของเมล็ดข้าว

ข้าวจัดเป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางอาหารด้านพลังงานสูง เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้ยังมีโปรตีน และไขมันมากกว่าธัญพืชอื่น เมล็ดมีความคงทนในการเก็บรักษาขนส่งได้สะดวก ราคาถูก และปลูกได้ง่าย จึงทำให้ประชากรโลกนิยมนำมาบริโภค หรือแปรรูป เพื่อใช้ประกอบเป็นอาหารหลักต่าง ๆ (จิตธนา และอรอนงค์, 2546)

โครงสร้างของเมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังภาพ 3 โดยมีโครงสร้างที่สำคัญคือ

#### 1. เปลือกหุ้มผล (pericarp)

ข้าวมีเปลือกหุ้มผลซึ่งประกอบด้วยเปลือกชั้นนอก (palea) และชั้นใน (lemma) (ศิริพร, 2527) โดยเป็นชั้นที่มีเซลล์แถวเดียว หรือแถวคู่ โดยเซลล์แถวในจะมีสารให้สีอยู่ด้วยทำให้เปลือกมีสีต่างกัน

#### 2. เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด (aleurone layer)

ประกอบด้วยเซลล์แถวเดี่ยว 2 – 3 แถว เป็นแหล่งสะสมของโปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุ รวมทั้งกรดไฟติก

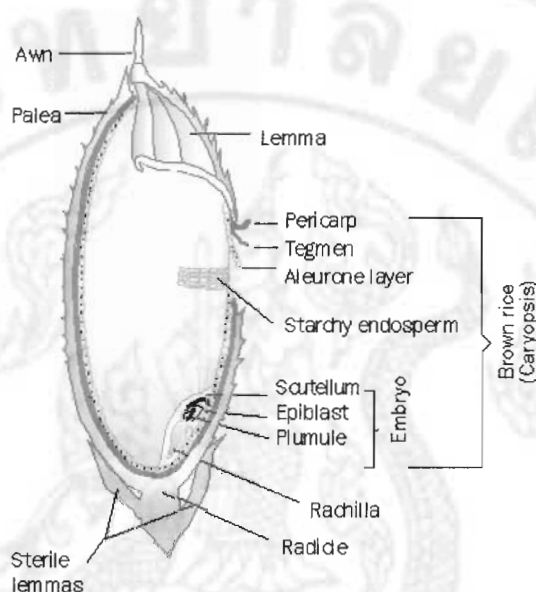
#### 3. เนื้อเมล็ด (endosperm)

เป็นเซลล์ที่มีผนังบางหุ้มเมล็ดแป้ง และสารอาหารอื่น ๆ ได้แก่ โปรตีน และไขมันอยู่ภายใน มีรูปร่างต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับบริเวณของเมล็ด ถ้าอยู่ใกล้ชั้นเยื่อหุ้มเมล็ดจะมีรูปร่างยาวรี ถัดเข้ามาถึงใกล้ใจกลางเมล็ด จะยิ่งกลมมนขึ้น

#### 4. เอมบริโอ (embryo)

เป็นส่วนที่จะเจริญไปเป็นต้นอ่อน อยู่ส่วนล่าง มีส่วนของใบเลี้ยง (scutellum) เพียง 1 ใบคั่นระหว่างเนื้อเมล็ดกับส่วนของเอมบริโอ ทำหน้าที่สะสมสารอาหาร โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ รวมทั้งสังเคราะห์แสงขณะเจริญอยู่เหนือดินในระยะแรก และค้ำกันเอมบริโอในระหว่างการงอก

เอมบริโอมีส่วนของเอพิบลาส (epiblast) ที่อยู่เหนือตำแหน่งของใบเลี้ยงขึ้นไป เป็นส่วนที่จะเติบโตเป็นลำต้น ใบ และดอก ซึ่งจะมีเยื่อหุ้มอยู่ด้านบน เรียกว่า เยื่อหุ้มยอดอ่อนแรกเกิด (coleoptile) และตอนปลายสุดจะเป็นยอดอ่อน (plumule) ในขณะที่อีกด้านจะเป็นส่วนที่เจริญเป็นราก (radicle)



ภาพ 3 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา: Ikisan (2005)

เมล็ดข้าวเมื่อสุกเต็มที่แล้ว 100 กรัม จะประกอบด้วยสารอาหารหลัก คือ คาร์โบไฮเดรต ประมาณ 80 กรัม โปรตีน 7 กรัม ไขมัน 0.8 กรัม แคลเซียม 24 มิลลิกรัม เหล็ก 1.4 มิลลิกรัม และวิตามินบี 1 และ บี 2 รวม 0.15 มิลลิกรัม เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารภายในของเมล็ดข้าวแล้ว จะพบว่า ข้าวมีคาร์โบไฮเดรตมาก แต่มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างต่ำ โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวจะมีปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบไม่สมดุลกัน โดยจะมีปริมาณของไลซีน (lysine) และทริปโตเฟน (tryptophan) ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวมีปริมาณไขมันต่ำ แต่ไขมันที่ได้เป็นไขมันที่มีคุณภาพดี (อัมมาร และวิโรจน์, 2533)

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายในเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จะพบว่าข้าวเจ้าบางสายพันธุ์ ได้แก่ นางพญา นางมล หอมแดงน้อย หอมกระดุกช้าง ข้าวราวขาว รวมทั้งข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวสันป่าตอง จะมีคุณภาพของโปรตีนในเมล็ดค่อนข้างสูง ในขณะที่ข้าว

เหนียวส่วนใหญ่มีโปรตีนในเมล็ดมากกว่าข้าวเจ้า แต่คุณภาพของโปรตีนค่อนข้างต่ำ (อัมมาร และ วิโรจน์, 2533)

### ปัญหาการขาดโปรตีนในประเทศไทย

ปัญหาทางโภชนาการของประเทศไทยมีอยู่มากมาย แต่ปัญหาที่สำคัญ คือ การขาดโปรตีน และพลังงาน (protein – calorie malnutrition) ซึ่งพบในทุกกลุ่มอายุ แต่พบมากในเด็ก และสตรีมีครรภ์ โดยเฉพาะในชนบท และแหล่งเสื่อมโทรม ปัญหาเหล่านี้มักเกิดขึ้นในประเทศที่มีการบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ซึ่งอาจจะเกิดจากการบริโภคข้าวอย่างไม่เพียงพอ การกินอาหารที่มีสัดส่วนไม่เหมาะสม รวมทั้งพฤติกรรมในการบริโภคของคนไทย ซึ่งเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของข้าวแล้ว การรับประทานข้าวเพื่อให้ได้พลังงาน และ โปรตีนเพียงพอจึงต้องรับประทานในปริมาณมาก ซึ่งหากรับประทานจนอิ่มแล้ว ก็ยังได้รับพลังงาน และ โปรตีนไม่เพียงพอ (อัมมาร และวิโรจน์, 2533)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีปริมาณ โปรตีนสูงขึ้นเป็นแนวทางหนึ่ง ซึ่งช่วยให้ข้าวมีคุณภาพของเมล็ดที่ดีขึ้น ในอดีตสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute : IRRI) และสถาบันวิจัยข้าวของไทยมีโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีโปรตีนเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่ประสบความสำเร็จ และล้มเลิกไปในที่สุด เนื่องจากข้าวที่ให้โปรตีนสูงมักให้ผลผลิตต่ำไม่คุ้มค่ากับการลงทุน นอกเสียจากจะสามารถขายได้ราคาสูงกว่าข้าวทั่วไปมาก และเมล็ดข้าวหลังการหุงต้มจะมีสีคล้ำ และได้ข้าวที่ค่อนข้างแข็ง เช่น ข้าวกล้อง เป็นต้น อีกทั้งการหาพันธุ์ข้าวที่จะให้มีโปรตีนที่มีคุณภาพเทียบเท่ากับโปรตีนจากสัตว์จึงเป็นเรื่องยาก เพราะโปรตีนจากธัญพืชจะมีไลซีน และทริปโตเฟนต่ำ การบริโภคโปรตีนจากเนื้อสัตว์จึงเป็นแนวทางที่เป็นไปได้มากกว่าในการแก้ปัญหาการขาดโปรตีน (อัมมาร และวิโรจน์, 2533)

### โปรตีนนมผึ้ง (Major Royal Jelly Protein: MRJP)

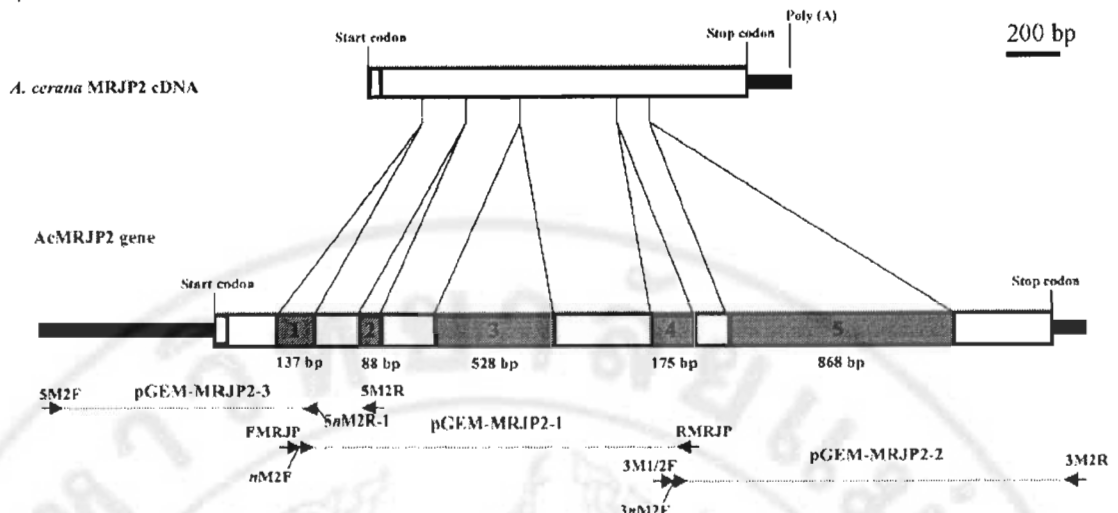
นมผึ้ง (royal jelly) เป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นโดยต่อมไฮโปฟารินเจียล (hypopharyngeal gland: HG) ของผึ้งนางพยาบาล ใช้เป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่จะเจริญไปเป็นผึ้งนางพญา (Malecová et al., 2003; Albert and Kludiny, 2004) โดยนมผึ้งมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ โปรตีน ร้อยละ 12 – 15 น้ำตาล ร้อยละ 10 – 16 และไขมัน ร้อยละ 3 – 6 โดยจะพบวิตามิน และกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีบทบาทสามารถใช้เป็นยา และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการได้ (Howe et al., 1985)

จากการศึกษา DNA และการหาลำดับเบส พบว่า โปรตีนในกลุ่มของ MRJP ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม (family) ได้แก่ MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 และ MRJP5 และเป็นองค์ประกอบหลักในนมผึ้งมากกว่า ร้อยละ 90 (Albert et al., 1999; Kludiny et al., 1994; Schmitzova et al., 1998; Okamoto et al., 2003) โดย MRJP ซึ่ง มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนสีเหลืองที่พบในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และ โปรตีนที่พบในแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งสันนิษฐานว่า MRJP ในนมผึ้งมีการวิวัฒนาการมาจากโปรตีนสีเหลืองของแมลงหวี่ (Albert and Kludiny, 2004) โดยเมื่อทำการศึกษารหัสพันธุกรรมของยีน *mrjp* พบว่า mRNA ของ MRJP1 จะพบปริมาณมากที่สุด ในต่อมไฮโปฟารินเจียลของทั้งผึ้งนางพยาบาล และ ผึ้งนางน้ำหวาน ในขณะที่ MRJP2, MRJP3 และ MRJP4 จะพบในต่อมไฮโปฟารินเจียลของผึ้งนางพยาบาลเท่านั้น (Malecová et al., 2003)

### ยีนโปรตีนนมผึ้ง (major royal jelly protein gene: *mrjp2*)

จากการศึกษา cDNA ของโปรตีนในกลุ่ม Major Royal Jelly Protein จากผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*) โดย Imjongirak et al. (2005) ได้ทำการแยก cDNA ของยีน *mrjp1* (GenBank accession no. AF525776) และ *mrjp2* (GenBank accession no. AF525777) ด้วยเทคนิค RT – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนทั้ง 2 ชนิด โดยออกแบบจาก cDNA ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) พบว่า ยีน AcMRJP2 มีขนาดประมาณ 1,392 นิวคลีโอไทด์ โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 463 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *mrjp2* จากผึ้งพันธุ์ (AmMRJP2) พบว่า มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และโปรตีน เท่ากับ ร้อยละ 92 และ 86 ตามลำดับ โดยยีน AcMRJP2 มีขนาด 3,963 คู่เบส ประกอบด้วย 6 เอกซอน และ 5 อินทรอน (ภาพ 4)

เมื่อทำการศึกษารหัสพันธุกรรมของยีน *mrjp2* เป็นโปรตีน Imjongirak et al. (2005) ได้ทำการควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวภายใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS พบว่ามีขนาดประมาณ 51.7 กิโลดาลตัน และเมื่อทำการแยกบริสุทธิ์แล้วได้ปริมาณโปรตีนประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำการวิเคราะห์โปรตีน MRJP2 แล้วพบว่า มีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นทั้ง 10 ชนิดสูงถึงร้อยละ 44.8



ภาพ 4 โครงสร้างของยีน *mrjp2* จากผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*)

ที่มา: Imjongirak et al. (2005)

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *mrjp* ในพืชนั้นได้มีรายงานการถ่ายยีน *mrjp1* เข้าไปในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) สายพันธุ์ Wi38 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ซึ่งมีการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมของ CaMV 35S RNA promoter และ nos 3' terminator พบว่ามีการแสดงออกของยีนในรุ่นลูกชั่วที่ 1 และ 2 (T<sub>1</sub> และ T<sub>2</sub>) เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนจากใบด้วยเทคนิค Immunoblotting (Júrová et al., 2004) ส่วนการถ่ายยีน *mrjp* ในข้าวเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อข้าว และสามารถเพิ่มปริมาณ และคุณภาพของโปรตีนนั้น ยังไม่พบรายงานที่เกี่ยวข้องทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ

### การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม และมีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายมากขึ้น จนกระทั่งนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่าง ๆ ในปัจจุบันพันธุวิศวกรรมเป็นกระบวนการคัดแปลงยีน หรือดีเอ็นเอของพืช โดยมีการย้ายยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ไปสู่พืช โดยยีนที่ย้ายเข้าไปสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ที่ต้องการ ทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะต่างไปจากพันธุ์เดิม (นิตยศรี และ สัมพันธ์, 2548)

การถ่ายยีนเป็นการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่เข้าไปในพืช เพื่อให้ได้พันธุ์พืชที่ดีตามต้องการ แต่ยังคงลักษณะที่ดีของพันธุ์เดิมไว้ ในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบ

อื่น การถ่ายยีนเข้าสู่พืช จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งยีนนั้นจะเข้าไปแทรกในจีโนมแบบสุ่ม การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีนี้มีลักษณะคล้ายกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม คือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม และเกิดการย้ายยีนในพืชเช่นเดียวกัน แต่จะแตกต่างกันตรงที่ไม่มีข้อจำกัดในการย้ายยีนซึ่งสามารถมาจากสิ่งมีชีวิตใดก็ได้

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช (plant transformation) มีรายงานความสำเร็จมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 ซึ่งเริ่มจากการนำยีนจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมาแทรกในโครโมโซมของพืช และพบว่ายีนสามารถเกิดการแสดงออกตามหน้าที่ของยีนได้ในพืช ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติของเซลล์พืชที่สามารถเจริญเป็นต้นพืชได้ (totipotent) และสามารถขยายพันธุ์ได้ตามปกติ โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการถ่ายยีน 2 ประการ (น้ำทิพย์, 2544) ได้แก่

1. ต้องการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ดีตามความต้องการของเกษตรกร และผู้บริโภค ไม่ว่าจะเป็นพืชสวน พืชไร่ และไม้ดอกไม้ประดับ

2. เพื่อศึกษากลไกการทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนการต่าง ๆ ทางชีววิทยา (biological process) ของพืชซึ่งเมื่อได้รับยีนแล้ว มีการแสดงออกของยีนในพืช จึงสามารถอธิบายบทบาทของยีนนั้นได้ ซึ่งอาจทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืช และจุลินทรีย์ก่อโรคในดินอีกด้วย

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่นิยมศึกษาวิจัย และนำมาใช้ในการถ่ายยีนจากแหล่งต่าง ๆ เข้าสู่พืชซึ่งมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพ และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีการ (อารีย์, 2542) ได้แก่

1. การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium* – mediated transformation)

เป็นการดัดแปลงกลไกทางธรรมชาติของแบคทีเรียแกรมลบในดิน คือ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืช เมื่อพืชเกิดบาดแผล และย้ายส่วนของ T – DNA เข้าแทรกในโครโมโซมของพืช แล้วก่อให้เกิดปุ่มปม ทำให้พืชผิดปกติ จึงได้มีการพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ใช้พลาสมิด Ti ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะสำหรับการถ่ายยีนในพืช โดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนพืช ด้วยยีนที่ต้องการบนส่วน T – DNA แล้วให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเกิดกลไกเลียนแบบธรรมชาติ นำยีนที่ต้องการไปแทรกในโครโมโซม เพื่อให้เกิดการแสดงออกในลักษณะที่ต้องการ (สุรินทร์, 2545; Hooykass, 1995)

## 2. การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

การถ่ายยีนวิธีนี้จะนำยีนที่ต้องการมาเคลือบบนอนุภาคทองคำ หรือทังสเตนซึ่งมีขนาดประมาณ 1 - 4 ไมครอน (สุรินทร์, 2545) แล้วใช้เครื่องยิงอนุภาคเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช โดยอาศัยแรงดันจากก๊าซที่เหมาะสม ด้วยความเร็วสูงเข้าไปในเซลล์พืช และเกิดการเชื่อมต่อของยีนกับดีเอ็นเอภายในจีโนมของพืช แล้วจึงทำการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับยีนต่อไป (Christou, 1997)

## 3. การใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

สำหรับการถ่ายยีนวิธีนี้จะต้องใช้เซลล์ไร้ผนัง หรือโปรโตพลาสต์ (protoplast) ผสมรวมกับพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการ แล้วใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรูชั่วคราว ซึ่งเมื่อกระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไปในสารละลาย ก็จะนำยีนที่ต้องการผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ซึ่งวิธีการนี้มีความยากในการชักนำให้โปรโตพลาสต์กลับมาเป็นต้นพืชปกติ

## 4. การใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG)

วิธีการนี้เป็นการใช้สารเคมีบางชนิด โดยเฉพาะ polyethylene glycol (PEG) เพื่อช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง (สุรินทร์, 2545) แล้วทำให้ยีนสามารถเข้าไปภายในเซลล์ของโปรโตพลาสต์ได้ วิธีการนี้จะได้ผลดีกับพืชที่สามารถเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้เป็นต้นได้

## การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อาศัยอยู่ในดินอย่างอิสระ โดยจะก่อให้เกิดโรค โดยการเข้าทำลายทางบาดแผลของพืช และทำให้เกิดเป็นปุ่มปม โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ได้หลายชนิด โดยเฉพาะในพืชตระกูล *Solanaceous* แต่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ (Hughes, 1996; สุรินทร์, 2545) เนื่องจากไม่ได้เป็นพืชอาศัย และเชื้ออะโกรแบคทีเรียไม่ตอบสนองต่อการเกิดบาดแผลในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Vasil, 1996; Christou, 1997)

การส่งถ่ายดีเอ็นเอจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าสู่โครโมโซมพืช เป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่ใช้ในการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรม โดยเกิดจากพลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid หรือ Ti-plasmid) ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140 - 325 กิโลเบส เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดขึ้นจะมีดีเอ็นเอบางส่วนแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชอย่างถาวร เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T-DNA ซึ่งเมื่อถูกส่งถ่ายเข้าไปในพืชแล้วจะทำให้ยีนเกิดการแสดงออก เพื่อให้พืชผลิตสารที่สำคัญสำหรับใช้ในเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ (Van Larebeke et al., 1974)

การใช้ Ti-plasmid ในการถ่ายยีนในพืช จะทำการแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปุ่มปมด้วยยีนที่ต้องการ ซึ่งจะถูกส่งถ่าย และเข้าไปแทรกในจีโนมของพืชแบบสุ่ม (Linda and Morris, 1994) โดยส่วนสำคัญที่จะทำให้เกิดการส่งถ่ายยีนที่ต้องการ คือ *vir* gene ที่อยู่ในเซลล์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งจะถูกกระตุ้นการทำงานด้วยสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) จำพวก acetosyringone และ  $\alpha$ -hydroxyl-acetosyringone โดยพืชปล่อยออกมาเมื่อเกิดบาดแผล และเกิดการตัดส่วนของ T-DNA โดยอาศัยการควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแล้ว จึงส่งถ่ายดีเอ็นเอแบบสายเดี่ยวเข้าสู่โครโมโซมพืช (Chan et al., 1993; Smith and Hood, 1995; Firoozabady and Adelheid, 1996)

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย เป็นวิธีการถ่ายยีนที่มีประสิทธิภาพสูง ส่งผลให้เกิดการแทรกตัวของยีนเพียง 1 ชุด (single copy) และ 1 ตำแหน่งบนจีโนม ทำให้การถ่ายยีนไปสู่วุ้นลูกหลานเป็นไปตามกฎเมนเดล ส่งผลให้เกิดกระบวนการขัดขวางการแสดงออกของยีนที่ถ่ายยีนเข้าไป เช่น gene methylation และ gene silencing น้อย และสามารถส่งถ่ายยีนส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้ แต่ยังคงมีปัญหาที่จะนำมาใช้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Vasil, 1994) ซึ่งยังต้องได้รับการพัฒนากระบวนการต่อไป

### การศึกษาการถ่ายยีนในพืชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ได้รับความสนใจจากนักวิจัยในการประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่าง ๆ เช่น ยาสูบ ข้าว ข้าวโพด มะเขือเทศ ถั่วลิสง เป็นต้น และได้มีการศึกษาวิจัยกันมาอย่างต่อเนื่องในปัจจุบัน โดยในประเทศไทยการศึกษาส่วนใหญ่เป็นเพียงเพื่อทำการพัฒนาระบบการถ่ายยีน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการถ่ายยีนต่าง ๆ ที่สนใจต่อไป ในขณะที่ในต่างประเทศได้เริ่มมีการวิจัย เพื่อเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมพืชต่าง ๆ โดยมีจุดประสงค์ที่สำคัญ 5 ประการ (อารีย์, 2542; นิตยศรี และ สัมพันธ์, 2548) คือ

#### 1. การเพิ่มคุณภาพของผลผลิต

การเพิ่มคุณภาพ และผลผลิตเป็นวัตถุประสงค์หนึ่งที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสามารถช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว ทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสภาพแวดล้อม รวมทั้งสามารถช่วยยกระดับความเป็นอยู่ และคุณภาพชีวิตของประชากรได้ การปรับปรุงองค์ประกอบให้มีคุณค่าทางโภชนาการเป็นทางหนึ่ง ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อประชากรส่วนใหญ่ของโลก เช่น ข้าวที่มีวิตามินเอสูง หรือข้าวสีทอง ซึ่งได้มีการถ่ายยีนจากต้นแคพพอดิล และ



แบคทีเรีย *Erwinia uredovora* เข้าไปให้เกิดการสร้างสารเบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารเริ่มต้นของวิตามินเอ (นิตยสาร และสัมพันธ, 2548)

การเพิ่มปริมาณโปรตีนในข้าวโดยการถ่ายยีน *lecA* จากถั่วลิสงเตาเข้าสู่ข้าวญี่ปุ่นสายพันธุ์นิพพอนบาร เพื่อให้มีปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อ endosperm มากขึ้น (Sindhu et al., 1997) การเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ในถั่วเหลือง และคาโนลา (*Brassica napus*) โดยการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดอะมิโน โดยใช้ยีน *dapA* จากแบคทีเรีย ทำให้พืชทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณไลซีนสูงขึ้น (Falco et al., 1995)

นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุงคุณภาพของผลผลิตให้ดีขึ้น เช่น การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีอายุการเก็บรักษาไว้ได้นานโดยการชะลอความสุกแก่ (นิตยสาร และสัมพันธ, 2548) การเพิ่มปริมาณของโปรตีน gluten ในข้าวสาลีด้วยยีนที่ผลิต HMW - GS (High Molecular - weight gluten subunit) ซึ่งทำให้แป้งข้าวสาลีมีคุณภาพในการทำขนมปังได้ดีขึ้น (Altpeter et al., 1996) รวมทั้งการถ่ายยีน *waxy* จากข้าวญี่ปุ่นเข้าสู่ข้าวที่มีปริมาณแป้งอะมิโลสมาก ทำให้ข้าวมีปริมาณแป้งอะมิโลเพคตินมากขึ้น เป็นการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของข้าวได้ เป็นต้น (อารีย์, 2542)

## 2. ความต้านทานสารปราบวัชพืช

กลไกการทำลายพืชของสารเคมีสังเคราะห์ปราบวัชพืช มีหลายกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีในพืชซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน และการสังเคราะห์แสงของพืชที่เรารู้จักกันดี คือ สารปราบวัชพืชพวก glyphosate ที่ทำลายโดยการไปยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน ได้แก่ ทริปโตเฟน ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน โดยยีน *epsps* ที่ถูกถ่ายเข้าพืชจะทำให้พืชสามารถผลิตเอนไซม์ EPSPS (5 - enol - pyruvylshikimate - 3 - phosphate synthase) ได้มากจึงยังคงผลิตกรดอะมิโนได้ตามปกติ พืชจึงไม่ตาย สารปราบวัชพืชพวก glufosinate จะยับยั้งไม่ให้ผลิต glutamine แต่ยีน *bar* หรือ *pat* จะไปเปลี่ยนองค์ประกอบของสารเคมีไม่ให้มีฤทธิ์ทำลายพืชได้ ทำให้พืชที่มียีนนี้สามารถต้านทานสารปราบวัชพืช นอกจากนี้ยังมีการถ่ายยีน *SURB - Hra* ที่ได้จากยาสูบเข้าไปในพืช เช่น มะเขือเทศ ชูการ์บีท อัลฟัลฟา ผักกาดหอม และแตง เพื่อให้ต้านทานสารปราบวัชพืชพวก sulfonylurea ซึ่งมีกลไกทำลายพืชโดยยับยั้งการผลิตกรดอะมิโน ได้แก่ ลิวซีน ไอโซลิวซีน และวาเลีน

## 3. ความต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืช

การถ่ายยีนเพื่อให้พืชมีความต้านทานโรค และแมลงเป็นสิ่งที่ไม่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการถ่ายยีนในกลุ่มของยีน *cry* จาก *Bacillus thuringiensis* เข้าสู่ข้าว เพื่อให้ต้านหนอนเจาะลำต้นชนิดต่าง ๆ เช่น ยีน *cryIAB* และ *cryIAC* (Cheng et al., 1998; Ahmad et al., 2002; Ramesh et al., 2004) นอกจากนี้ยังสามารถพบการถ่ายยีนได้ในพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวโพด

ฝ้าย (นิตยศรี และสัมพันธ์, 2548) แต่แมลงบางกลุ่มไม่สามารถควบคุมได้ด้วย Bt toxin genes ซึ่งผลิตโปรตีนพิษที่สามารถฆ่าแมลงได้ เรียกว่า insecticidal proteins โปรตีนที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงอย่างอื่นได้รับความสนใจจะนำมาใช้ประโยชน์เพื่อควบคุมแมลงชนิดอื่น คือ cholesterol oxidase ที่มีประสิทธิภาพฆ่าตัวหนอนของแมลงพวกด้วง (weevils) ซึ่ง Cho et al. (1995) ได้ถ่ายยีน *choA* ที่ได้จาก *Streptomyces* เข้ายาสูบ ทำให้ยาสูบต้านทานหนอนกินใบ การถ่ายยีนที่ผลิตโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เรียกว่า protease inhibitor เช่น ยีน *CpTI* ที่ได้จากถั่ว cowpea เข้าไปในยาสูบ ทำให้ยาสูบต้านทานแมลง (Hilder et al., 1987) สารประกอบพวก lectins ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง รา และแบคทีเรีย เช่น lectin ที่ได้จากข้าวสาลี และละหุ่ง มีพิษต่อแมลงศัตรูข้าวโพด (*Ostrinia nubilalis* และ *Diabrotica undecimpunctata howadi*) (Czapla and Lang, 1990)

กลไกอีกอย่างหนึ่งที่สำคัญที่พืชป้องกันตนเอง คือ การผลิตสารประกอบออกมาทำลายเชื้อโรค เช่น phytoalexins และ PR (pathogenesis – related) proteins การผลิตเอนไซม์ไคทิเนส และ glucanase ของพืชที่ตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อรา หรือแบคทีเรีย จะไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคไม่ขยายปริมาณ ดังนั้นจึงมีการถ่ายยีนที่ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวเข้าไปในพืช เช่น การส่งถ่ายยีนไคทิเนสเข้าสู่ข้าวญี่ปุ่น เพื่อให้ต้านทานต่อเชื้อรา *Magnaporthe grisea* บางชนิดที่เป็นสาเหตุต่อการเกิดโรคไหม้ (Nishizawa et al., 1999) และเข้าสู่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (เกศสุคนธ์ และคณะ, 2548) การถ่ายยีน *RIP* (ribosome – inactivating protein) ที่ได้จากข้าวบาร์เลย์สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของโรค ซึ่ง Logemann et al. (1992) ถ่ายเข้าไปในยาสูบเพื่อต้านทานต่อ *Rhizoctonia solani* เมื่อพืชมีเอ็นนี้ร่วมกับ CHI (chitinase) จึงสามารถต้านทานต่อ *Rhizoctonia solani* ได้ดีกว่ามี RIP เพียงอย่างเดียว

รวมทั้งการสร้างภูมิคุ้มกันให้พืช โดยการถ่ายยีนที่ผลิต coat protein ของไวรัส ทำให้พืชต้านทานต่อโรคที่เกิดจากไวรัสได้ เช่น มะเขือเทศ และมันฝรั่งต้านทานต่อไวรัสสายพันธุ์ PVX และ PVY (นิตยศรี และสัมพันธ์, 2548) โดย Truve et al. (1994) ได้ถ่ายยีนจากหนูซึ่งผลิตเอนไซม์ oligoadenylate synthetase ที่ทำลาย RNA ของไวรัส ทำให้มันฝรั่งที่ได้รับยีนนี้ต้านทานต่อไวรัส PVX นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค antisense เข้ามาร่วมในการถ่ายยีน เพื่อให้เกิดการต้านทานต่อโรคในพืช เช่น การถ่ายยีน PDR ซึ่งเป็น RRSV segment 5 antisense เข้าสู่ข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอม และน้ำรู่ เพื่อให้ต้านทานต่อไวรัสโรคข้าว (น้ำทิพย์, 2544)

#### 4. ความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม

การเพิ่มความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม จะส่งผลให้มีการเพิ่มผลผลิตของพืชได้ในสภาพที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ เช่น ในพื้นที่ที่มีความเค็มสูง พื้นที่แห้งแล้ง เป็นต้น โดยการแก้ปัญหาเหล่านี้ทำได้โดยการถ่ายยีน *adc* (Arginine decarboxylase) จากข้าวโอ๊ต (*Avena sativa* L.) เข้าสู่ข้าว

ญี่ปุ่น TNG (Roy and Wu, 2001) เพื่อให้เพิ่มการสังเคราะห์ polyamine ให้ด้านทานความเค็ม และเพิ่ม biomass รวมทั้งเติบโตได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

นอกจากนี้ยังได้มีการถ่ายยีนเพื่อให้ข้าวสามารถเติบโตได้ในสภาวะแห้งแล้ง เช่น การถ่ายยีน *MnSOD* (Manganese superoxide dismutase) จากถั่วลิสงเตา ภายใต้การควบคุมของ oxidative stress – inducible promoter เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Zhonghua 11 (Wang et al., 2005) รวมทั้งการถ่ายยีน *DREB1A* เข้าไปใน *Arabidopsis* (Kasuga et al., 2004) ทำให้พืชที่ได้รับยีนอยู่ในสภาพแห้งแล้งได้ดีกว่าพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

##### 5. การใช้ประโยชน์อื่น ๆ และทางการค้า

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาพืชให้สามารถใช้ประโยชน์ในทางการค้ามากขึ้น โดยจะใช้ในการผลิตยา หรือสารต่าง ๆ ในการวินิจฉัย และรักษาโรค โดยการถ่ายยีนที่ผลิตสารที่ต้องการเข้าไปสู่พืช ซึ่งเริ่มมีการศึกษาในกลุ่มของข้าวโพด อัลฟัลฟา มันฝรั่ง ถั่วเหลือง และมะเขือเทศ ซึ่งมีความสามารถในการสร้างโปรตีนได้สูง เพื่อลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง ปัจจุบันพบยาที่สร้างได้จากพืช ได้แก่ galactosidase เป็นต้น รวมทั้งในอนาคตยังได้มีการขยายการวิจัย เพื่อใช้ในการผลิตวัคซีน และแอนติบอดีต่าง ๆ อีกด้วย

นอกจากนี้ การถ่ายยีนเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางชีวเคมี เช่น การถ่ายยีนสร้างกรดลอริก (lauric acid) จาก California bay tree เข้าสู่คาโนลาซึ่งเป็นพืชน้ำมัน ทำให้สามารถผลิตกรดไขมันชนิดนี้ในน้ำมัน เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ ผงซักฟอก และเครื่องสำอางได้ (อารีย์, 2542; นิตยศรี และสัมพันธ์, 2548) การผลิตพืชเรืองแสงโดยใช้ยีนจากหิ่งห้อย (ยีน *luc*) และแมงกะพรุน (ยีน *gfp*) ทำให้พืชสามารถเรืองแสงได้ในที่มืด ซึ่งจัดเป็นไม้ดอกไม้ที่มีความแปลกตาเช่น งานวิจัยของศาสตราจารย์ Chia Tet Fatt และคณะ จากสถาบันการศึกษาแห่งชาติ ประเทศสิงคโปร์ ที่ได้ทำการศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวาย (นิตยศรี และสัมพันธ์, 2548)

การใช้พืชเพื่อช่วยในการปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพแวดล้อม โดยอาศัยความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารพิษ หรือลดความเป็นพิษ เช่น การถ่ายยีน *gstI* (glutathione S – transferase I) จากข้าวโพด เข้าสู่ยาสูบ เพื่อให้ลดความเป็นพิษของยาปราบวัชพืชในกลุ่มของ chloroacetanilide (Karavangeli et al., 2005)

## ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโครแบคทีเรียม

ปัจจัยต่าง ๆ หลายอย่างมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน Chyi and Phillips (1987) พบว่า ความสำเร็จของการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโครแบคทีเรียมขึ้นอยู่กับขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่ การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ และการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งการเลือกใช้ชิ้นส่วนพืชเพื่อการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยสามารถแบ่งได้เป็นปัจจัยที่สำคัญได้ดังนี้

### 1. ลักษณะชิ้นส่วนพืช และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนเป็นสิ่งสำคัญ การเลือกใช้นเนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีความสามารถในการเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นต้นได้ค่อนข้างสูง เป็นแนวทางหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (Smith and Hood, 1995) จากการศึกษาพบว่า แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีน ซึ่งควรเป็นแคลลัสชนิดเอมบริโอเจนิค ซึ่งมีการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสจากหลายส่วนของข้าว เช่น ลำต้น ราก (Wu and Li, 1970) อับละอองเกสร (Chu et al., 1975) และบริเวณสควเทลลา (scutella) ของเมล็ดแก่ (Hiei et al., 1994; Toki, 1997; Rashid et al., 1996; Pipatpanukul et al., 2004; ประภา, 2532; อนุรักษ์ และสุพัตรา, 2543) โดยเมล็ดแก่เป็นส่วนที่นิยมนำมาใช้เพาะเลี้ยงมากที่สุด เพราะทนทานต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้ดี

นอกจากนี้องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็เป็นสิ่งสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส Casein hydrolysate และ L – proline เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกกรดอะมิโน ซึ่งนิยมเติมลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดข้าว โดยจะสามารถช่วยในการกระตุ้นการเจริญและพัฒนาของแคลลัสได้ดี และเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดแคลลัส และแคลลัสชนิดเอมบริโอเจนิคได้ เห็นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวไร้พันธุ์ดอกพยอม และน้ำรู เพื่อใช้ในการถ่ายยีนไวรัสสาเหตุของโรคข้าว (น้ำทิพย์, 2544) สอดคล้องกับงานของ Poçaim et al. (1995) ว่า การใช้ L – proline และ Casein hydrolysate ในอาหาร N6 ซึ่งดัดแปลงเพื่อใช้ในการชักนำแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี และ L – proline สามารถช่วยในการเจริญของแคลลัสได้ โดยพบว่า เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะสามารถหลุดออกจากแคลลัสได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการเกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้ในอัตราสูง

แม้ว่าฮอร์โมน 2, 4 – D เพียงอย่างเดียวจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Raina et al., 1987) แต่การเพิ่มสารอินทรีย์บางชนิด เช่น casein hydrolysate และ tryptophan ลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มี 2, 4 – D จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดแคลลัสของข้าวได้ (Vajrabhaya et al., 1986; ประภา และพรทิพย์, 2537)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวไทยได้มีการศึกษากันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากข้าวไทยเป็นข้าวชนิดอินดิกา ซึ่งมีรายงานว่ามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการถ่ายยีนต่ำกว่าข้าวชนิดจาปอนิกา จำเป็นต้องทำการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส และมีความพยายามเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นให้สูงขึ้นตลอดมา (พรทิพย์, 2537) Pipatpanukul et al. (2004) พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ กข 6 บนอาหารสูตร N6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส ร้อยละ 3 และฮอร์โมน 2, 4 - D เข้มข้น 22.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีแสง มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เกิดแคลลัส และอาหารสูตร N6 ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส ร้อยละ 3 ฮอร์โมน IAA และ BA เข้มข้น 2.5 และ 2.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้เจริญเป็นต้นได้

## 2. วิธีการถ่ายยีน และสภาวะการเพาะเลี้ยงร่วม

เนื่องจากการตอบสนองต่อบาดแผลของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจำพวกข้าวนั้นจะแตกต่างจากพืชใบเลี้ยงคู่ โดยเซลล์ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่อยู่ที่บาดแผลจะมีการสร้างสารพวกลิกนิน เพื่อปิดปากแผลโดยไม่เกิดการแบ่งเซลล์ (Kahl et.al., 1982) และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ผลิตสารประกอบ phenolic ได้น้อย จึงมีการเติม acetosyringone ให้เหมาะสมต่อการทำงานของ *vir* gene ในพลาสมิด Ti ที่อยู่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เพื่อกระตุ้นการทำงานของ *vir* gene ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และในองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วม (Smith and Hood, 1995) ซึ่งความเข้มข้นของ acetosyringone ที่เดิมจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น สายพันธุ์ของข้าว โดย Hiei et al. (1994) รายงานว่าการเติม acetosyringone ที่ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นปัจจัยที่ช่วยให้การถ่ายยีนในข้าวประสบความสำเร็จ และได้รับพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plants) จำนวนมาก และพืชเหล่านี้สามารถถ่ายทอดยีนให้กับรุ่นลูกหลานได้ ในขณะที่ Saharan et al. (2004) ได้มีการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ acetosyringone ที่มีผลต่อการถ่ายยีน ในข้าวพันธุ์ HKR - 46 และ HKR - 126 พบว่า acetosyringone ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์จะทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุด

การถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์พืช ไม่สามารถยีนยีนผลได้โดยดูจากลักษณะทางกายภาพเพียงอย่างเดียว จำเป็นต้องใช้ยีนเครื่องหมายเข้ามาช่วย เพราะอัตราการถ่ายยีนค่อนข้างต่ำ การใช้ยีนเครื่องหมายจึงสามารถช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับยีนในช่วงแรกจากเนื้อเยื่อจำนวนมากที่ได้รับการถ่ายยีน (Angenon et al., 1994) โดยยีนเครื่องหมายจะแทรกอยู่ในส่วนของเวกเตอร์ และจะแทรกเข้าไปในโครโมโซมพืช หลังการถ่ายยีนเซลล์ที่ได้รับยีนจะแสดงลักษณะการต้านทาน และสามารถเจริญได้ในสารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือก โดยเนื้อเยื่อส่วนใหญ่

ที่ไม่ได้รับยีนจะไม่สามารถเจริญได้ และตายในที่สุด (Komari et al., 1996) โดยการคัดเลือก จำเป็นต้องมีปริมาณ หรือความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการคัดเลือกที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดการ ยับยั้งการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์ที่ได้รับยีนต่อไป โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ใช้ในการ คัดเลือกด้วย เช่น cefotaxime มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ หากใช้ในปริมาณมากเกินไป จะทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลืองซีด และตายในที่สุด ในขณะที่ timentin มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นต้น เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ ออกซิน (เกษณี, 2546)

Hamid et al. (1996) พบว่า แคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ใน อาหารที่มี acetosyringone จะมีการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งจะแสดงผล GUS activity สูงสุด เมื่อ ทำการเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลานาน 2 – 3 วัน สอดคล้องกับการทดลองของ Rashid et al. (1996) ซึ่ง ได้ศึกษาการถ่ายยีน โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม เข้าสู่ข้าวอินดิกา 3 สายพันธุ์ คือ Basmati 370, Basmati 385 และ Basmati 6129 พบว่า แคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม ใน อาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่เติม acetosyringone จะมีการแสดงออกของยีน *gus* แต่การแสดงออกของยีน *gus* จะไม่พบในแคลลัสที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมในอาหารที่ไม่เติม acetosyringone โดยจะแสดงผล GUS activity มากที่สุด หลังการเพาะเลี้ยงร่วมนาน 2 – 3 วัน และหลังจากนั้นการแสดงออกจะลดลง

### 3. สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และเวกเตอร์

เชื้ออะโกรแบคทีเรียมแต่ละสายพันธุ์ (strain) มีความสามารถในการเข้าบุกรุกพืช แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับยีน *vir* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *virA* และ *virG* ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ *vir* ตำแหน่งอื่น ๆ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *virG* ทำให้ประสิทธิภาพการเข้าทำลาย หรือถ่ายยีนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *virG* ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเข้าทำลาย ตลอดจนเพิ่มชนิดพืชที่เป็นเจ้าบ้าน (host range) ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมได้ (กษิธิฐ, 2544)

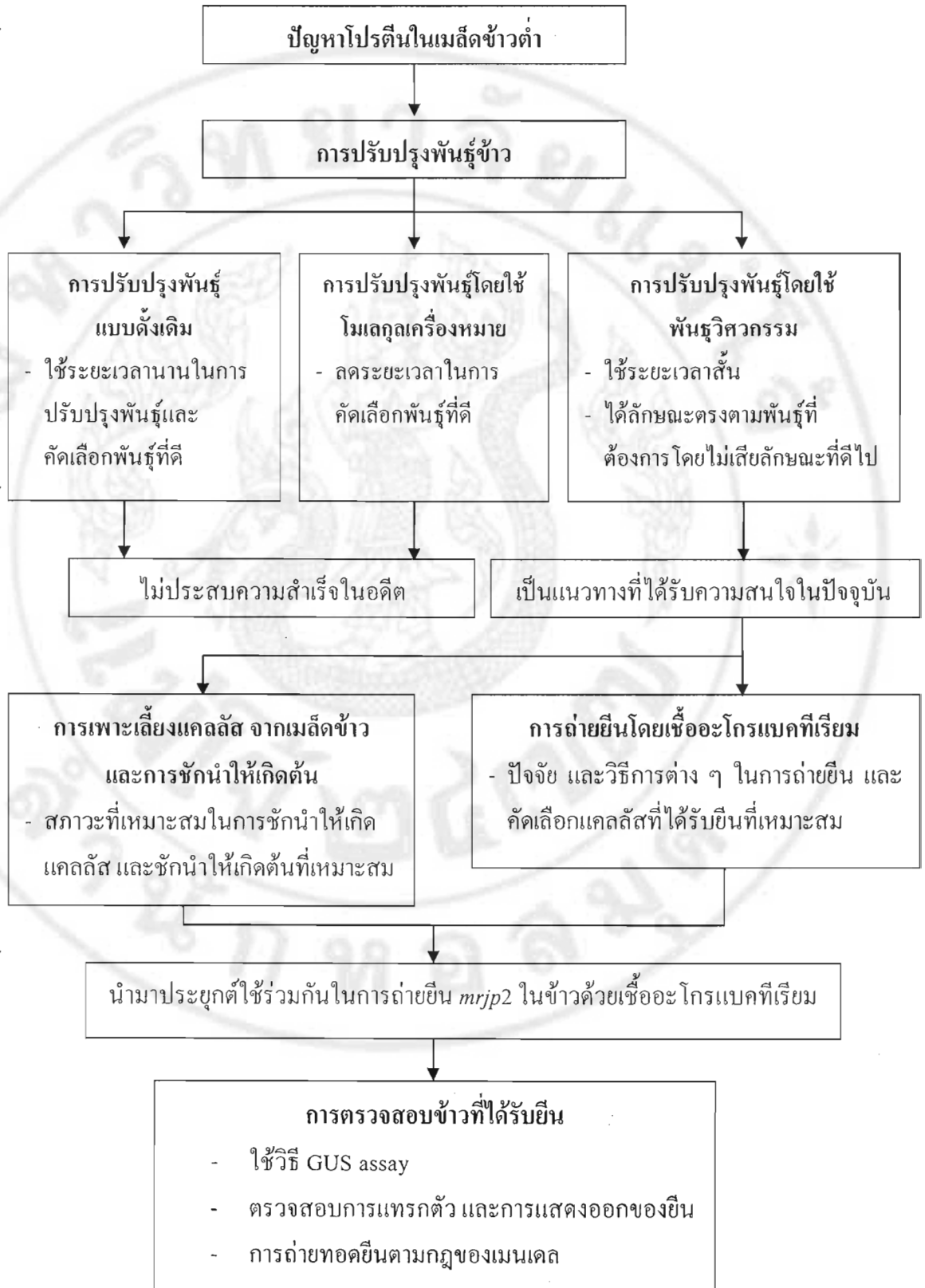
การเลือกใช้ชนิดของเวกเตอร์ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนมีความสำคัญ เนื่องจากเวกเตอร์เป็นส่วนสำคัญที่จะส่งถ่ายยีนเข้าไปในพืช โดยจะมีการตัดแปลงพลาสมิด Ti โดยการตัดส่วนที่จะทำให้เกิดปุ่มปมในพืชออก และแทนที่ด้วยยีนที่สนใจ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ co – integrate vector (Hood et al., 1986) และ binary vector (Komari et al., 1996) ซึ่งแต่ละระบบจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน และส่งผลให้เกิดประสิทธิภาพในการถ่ายยีนที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด

เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีผลต่อชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิดต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนแตกต่างกันด้วย โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ

กัน ความสามารถในการส่งถ่ายยีนจะขึ้นอยู่กับการแสดงออกของ *vir* gene สายพันธุ์ของเชื้ออะโกราแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนในข้าวไทย ได้แก่ EHA101 (อนุรักษ์ และนิตยศรี, 2544) EHA105 (ลาวัลย์ และคณะ, 2543; จันทร์ประภา, 2543; อนุรักษ์ และสุพัตรา, 2543; อนุรักษ์ และนิตยศรี, 2544; Pipatpanukul et al., 2004) LBA4404 (อนุรักษ์ และนิตยศรี, 2544; Pipatpanukul et al., 2004) และ AGL1 (อนุรักษ์ และนิตยศรี, 2544; ช่อทิพา และคณะ, 2547)



## กรอบแนวความคิด





### บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

1. ข้าวเหนียว (*indica* rice) พันธุ์ กข 6 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
2. ข้าวญี่ปุ่น (*japonica* rice) พันธุ์ Kitaake ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Thomas W. Okita, Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

#### เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Thomas W. Okita, Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

#### พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

1. พลาสมิด pET\_mrjp2 ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ศิริพร สิทธิประณีต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. พลาสมิด pCAMBIA1305.2 ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
3. พลาสมิด pRTL2 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Thomas W. Okita, Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. พลาสมิด pBluescript KSII+ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

## วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
2. กระบอกลวด (cylinder)
3. บีกเกอร์ (beaker)
4. หลอดไมโครทิวป์ (microtube)
5. ขวดรูปชมพู่ (flask)
6. ขวด Duran
7. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
8. ขวดแก้วขนาด 80 ออนซ์
9. ปากกีสบ
10. มีดผ่าตัด
11. ตะแกรง
12. ลูกป่น
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์

### เครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer: Perkin Elmer, model Lambda 25, Germany)
2. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave: Astell Scientific, model ASB260, England)
3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker: STUART Scientific, model SI 50, UK)
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker: SANYO GALLENKAMP PLC, model IOX400.XX2.C, UK)
5. เครื่องเขย่า (platform shaker: New Brunswick Scientific, model innova 2100, USA)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter: Satorius, model PP – 50, Germany)
7. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet: Forma Scientific, model 1285, USA)
8. ตู้เพาะเลี้ยงต้นไม้แบบควบคุมอุณหภูมิ (growth chamber: GIANT STAR, model GS – 1000 CL, Korea)
9. ตู้อบลมร้อน (hot air oven: BINDER, model ED115(E2), Norway)

10. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator: BINDER, model ED240(E2), Norway)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath: Julabo, model TW 20, U.S.A)
12. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (balance: METTLER – TOLEDO, model PG802 – S, Switzerland)
13. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance: METTLER – TOLEDO, model AG285, Switzerland)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge: Kando Laboratories, model SOVALL<sup>®</sup> Biofuge pico, Germany)
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge: ANDREAS HETTICH, model UNIVERSAL 32, Germany)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge: MSE, model HARRIER18/80, UK)
17. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กและเตาให้ความร้อน (magnetic stirrer and hot plate: JENWAY, model 1000, UK)
18. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (gel electrophoresis: Gel mate 2000, model GEP – 103, Japan)
19. เครื่องเขย่าผสม (vortex: Scientific Industries, model G – 560E, USA)
20. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine: MJ research, model PTC 1196 HB, USA)
21. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (gel electrophoresis: BIO – RAD, model Mini PROTEAN<sup>®</sup> 3Cell, USA)
22. เครื่องย้ายสารพันธุกรรมจากแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน (mini – Protein blot: BIO – RAD, model Mini Trans – Blot<sup>®</sup> Cell, USA)
23. เครื่องวัดปริมาณโปรตีน (microplate reader: BIO – RAD, model 680XR, USA)
24. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereo microscope: Olympus, model SD 3045, )

#### สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

1. Acetic acid (Merck, Germany)
2. Ammonium Chloride (Merck, Germany)
3. Agar powder (Himedia Laboratories, India)
4. Agarose (Nippon Gene, Japan)
5. Ammonium nitrate (Merck, Germany)
6. Ammonium persulfate (BIO – RAD, USA)
7. Ammonium sulphate (Ajax, Australia)

8. Ampicillin trihydrate (Fluka, Switzerland)
9.  $\alpha$  - Naphthaleneacetic acids (NAA: PhytoTechnology, USA)
10. Acetosyringone (AS; 3, 5 - Dimethoxy - 4 - hydroxy acetophenone: Fluka, Switzerland)
11. Boric acids (Fisher, UK)
12. Bromophenol blue (Fisher, UK)
13. Bromothymol blue (Fisher, UK)
14. Calcium chloride dehydrate (Merck, Germany)
15. Casamino acids (Casein hydrolysate: Fluka, Switzerland)
16. Casein Enzyme Hydrolysate (Tryptone Type I: Himedia Laboratories, India)
17. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB: Bio basic, Canada)
18. Chloroform (Lab Scan, Thailand)
19. Cobalt (II) chloride (Ajax, Australia)
20. Coomassie Brilliant Blue R - 250 (BIO - RAD, USA)
21. Copper (II) sulphate (Ajax, Australia)
22. 2, 4 - Dichlorophenoxyacetic acids (2, 4 - D: PhytoTechnology, USA)
23. D - glucose anhydrous (Fisher, UK)
24. Diaminoethanetetra - acetic acid disodium salt ( $\text{Na}_2$  EDTA: Fisher, UK)
25. Dimethyl sulfoxide (DMSO: Merck, Germany)
26. Dithiothreitol (DTT: BDH, England)
27. di - Potassium hydrogen orthophosphate (Fisher, UK)
28. di - Sodium hydrogen orthophosphate (Fisher, UK)
29. D - Sorbitol (Merck, Germany)
30. Ethanol (Merck, Germany)
31. Gelrite gellan gum (Sigma, Germany)
32. Glycerol (Merck, Germany)
33. Glycine (Fisher, UK)
34. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
35. Hygromycin B (A.G. Scientific, USA)
36. Indole-3-Acetic acid (IAA: PhytoTechnology, USA)
37. Iron (II) sulphate (Fisher, UK)

38. Isobutanol (Iso – butyl alcohol: Fisher, UK)
39. Kanamycin sulphate (Bio basic, Canada)
40. Kinetin (6 – furthrylaminopurine: PhytoTechnology, USA)
41. L – Aspartic acids (Sigma, Germany)
42. L – Glutamine (Fluka, Switzerland)
43. L – Proline (PhytoTechnology, USA)
44. Magnesium sulfate heptahydrate (Fisher, UK)
45. Manganese (II) sulphate monohydrate (Ajax, Australia)
46. Methanol (Merck, Germany)
47. 2 – Mercaptoethanol (BIO – RAD, USA)
48. Myo – Inositol (Fluka, Switzerland)
49. Nicotinic acids (Fluka, Switzerland)
50. Polyvininylpyrrolidone (PVP – 40: PhytoTechnology, USA)
51. Potassium chloride (Merck, Germany)
52. Potassium dihydrogen orthophosphate (Fisher, UK)
53. Potassium hexacyanoferrate (II) (Fisher, UK)
54. Potassium hexacyanoferrate (III) (Fisher, UK)
55. Potassium hydroxide (Merck, Germany)
56. Potassium iodide (Ajax, Australia)
57. Potassium nitrate (Merck, Germany)
58. Pyridoxine hydrolysate (Fluka, Switzerland)
59. Rifampicin (สยามเภสัช, ไทย)
60. Sodium acetate trihydrate (Merck, Germany)
61. Sodium chloride (Merck, Germany)
62. Sodium dihydrogenphosphate (Fisher, UK)
63. Sodium dodecyl sulphate (SDS: BIO – RAD, USA)
64. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
65. Sodium metabisulphite (Sigma, Germany)
66. Sucrose (BDH, England)
67. N,N,N',N' – Tetra – methyl – ethylenediamine (TEMED: BIO – RAD, USA)

68. Thidiazuron (TDZ: Sigma, Germany)
69. Timentin (GlaxoSmithKline, USA)
70. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris base: National diagnostics, USA)
71. Thiamine (Vitamin B1 hydrolysate: Fluka, UK)
72. 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl glucuronide(X – gluc: Amesco, Philippines)
73. Yeast extract (Bio basic, Canada)
74. Zinc sulphate (Ajax, Australia)
75. 30%Acrylamide/Bis solution (29: 1) (3.3%C) (Bio – Rad, USA)
76. Lysozyme (Amesco, Philippines)

#### ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit)

1. Gene JET plasmid miniprep kit (Fermentas, USA)
2. QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, USA)
3. QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA)
4. Nucleospin RNA/Protein (MN, Germany)
5. Penta His<sup>TM</sup> HRP conjugate kit (QIAGEN, USA)
6. Super signal West His Probe<sup>TM</sup> kit (PIERCE, USA)
7. BioRad Protein Assay (BIO – RAD, USA)
8. MasterPure<sup>TM</sup> RNA Purification kit (EPICENTRE, USA)
9. GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep kit (Fermentas, USA)
10. MasterAmp<sup>TM</sup> RT – PCR kit(EPICENTRE, USA)

#### ดีเอ็นเอและโปรตีนมาตรฐาน (DNA and Protein Markers)

1.  $\lambda$ /HindIII + EcoRI, ready to use (Fermentas, USA)
2. GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder Plus, ready to use (Fermentas, USA)
3. GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder Plus, ready to use (Fermentas, USA)
4. MassRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder, High Range, ready to use (Fermentas, USA)
5. PageRuler<sup>TM</sup> unstained Protein Ladder (Fermentas, USA)

6. PageRuler™ prestained Protein Ladder (Fermentas, USA)

7. 6xHis Protein Ladder (QIAGEN, USA)

### เอนไซม์

1. *Nco*I (New England Biolab, USA)
2. *Pst*I (New England Biolab, USA)
3. *Sac*I (New England Biolab, USA)
4. *Bam*HI (New England Biolab, USA)
5. *Eco*RI (New England Biolab, USA)
6. *Cla*I (New England Biolab, USA)
7. *Hind*III (New England Biolab, USA)
8. T4 Ligase (New England Biolab, USA)
9. *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)
10. *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA)
11. 2X Blumix DNA polymerase (RBC bioscience, USA)

### ไพรเมอร์ (Primer)

1. F1\_mrjp2 (5' – TGT GCT CCA AAG TTG CAT GT – 3')
2. R1\_mrjp2 (5' – ACG CCA TCT TTC GAT ACT GC – 3')
3. F\_hptII – 1 (5' – CTT GAC ATT GGG GAG TTT AGC GAG A – 3')
4. R\_hptII – 1 (5' – ATC GGC GAG TAC TTC TAC ACA GCC A – 3')
5. F\_NcoImrjp2 (5' – CAT ACC ATG GCT AGC CAT CAT CAT CAT – 3')
6. R\_SacImrjp2 (5' – CCC GAG CTC ATT ATC ATT CTA ATT GTT AG – 3')
7. MRJP2Seq3' (5' – GAA GAG CTT CCA CAT TTC GTA GG – 3')
8. MRJP2Seq5' (5' – GTC CAC CCT TAC CGA TTT TGT TAG – 3')

## อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเชื้อแบคทีเรีย

1. อาหารสูตร N6 (Chu, 1978)
2. อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
3. อาหารสูตร AB (Toki, 1997)
4. อาหารสูตร AAM (Toki, 1997)
5. อาหารสูตร AS (Toki, 1997)
6. อาหารสูตร Luria Bertoni (LB)

### วิธีการทดลอง

ในการทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ได้แก่

1. การสร้างพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนในข้าว
2. การศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake
3. การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าว
4. การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวคัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ โดยแต่ละการทดลองมีรายละเอียด ดังนี้

#### การทดลองที่ 1 การสร้างพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนในข้าว

##### วิธีการทดลอง

ในการสร้างพลาสมิดเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนในข้าว โดยให้มีชุดยีนโปรตีนนมผึ้ง หรือ major royal jelly protein gene: *mrjp2* (Accession no. AF525777) ซึ่งควบคุมการทำงานโดย 35S double promoter, TEV Leader และ 35S terminator แล้วทำการแทรกเข้าไปยังพลาสมิด pCAMBIA1305.2 เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าว

##### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ในการสร้างพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีนโปรตีนนมผึ้งสำหรับใช้ในการถ่ายยีนในข้าว ทำการบันทึกผลและนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของภาพถ่ายจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และภาพวาดแผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ที่ได้



## การทดลองที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

### วิธีการทดลอง

เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ซึ่งได้มีรายงานไว้ตามวิธีการของ นิซุมิน (2547) และ Toki (1997) ตามลำดับ แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD)

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ทำการเก็บผลขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้น และจำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัส แล้วนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของตารางบันทึกผล โดยแสดงร้อยละของเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัส และขนาดของกลุ่มแคลลัส พร้อมทั้งภาพประกอบ ส่วนการชักนำให้เกิดต้น แสดงผลในรูปแบบของรูปภาพ

## การทดลองที่ 3 การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าว

### วิธีการทดลอง

เปรียบเทียบการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Toki (1997) โดยทำการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ และตรวจสอบการถ่ายยีน โดยอาศัยการแสดงออกของยีนคัดเลือกและยีนรายงานผล และใช้เทคนิค PCR, RT – PCR, SDS - PAGE และ Western blot ในการตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งในจีโนมของข้าวในระดับต่าง ๆ

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการเก็บผลกลุ่มแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก แคลลัสที่สามารถเจริญเป็นต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม และทำการนำเสนอข้อมูลในรูปแบบตารางบันทึกผล พร้อมทั้งรูปภาพประกอบ ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแสดงผลในรูปแบบของรูปภาพ

## การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

### วิธีการทดลอง

ทำการปลูกข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T<sub>0</sub> ในโรงเรือน เปรียบเทียบกับข้าวปกติ แบบสุ่มสมบูรณ์ โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ได้แก่ ความสูงของต้น จำนวนวันออกดอก จำนวนกอ จำนวนรวง จำนวนเมล็ด และปริมาณโปรตีนในเมล็ด

### การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

ทำการเก็บผลความสูงของต้น จำนวนวันออกดอก จำนวนกอ จำนวนรวง จำนวนเมล็ด และปริมาณโปรตีนในเมล็ด และทำการนำเสนอข้อมูลในรูปแบบตารางบันทึกผล พร้อมทั้งรูปภาพประกอบ

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

### วิธีการดำเนินงาน

#### 1. การสร้างพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *mrjp2* สำหรับถ่ายยีนในข้าว

ทำการเตรียมยีน *mrjp2* (Accession no. AF525777) ซึ่งอยู่ในพลาสมิดเวกเตอร์ pET\_*mrjp2* โดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ให้มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* บริเวณปลาย 5' และ 3' พร้อมทั้งให้มีบริเวณ 6xHis - tag ที่ปลาย 5' เพื่อช่วยในการแยกบริสุทธิ์ และตรวจวิเคราะห์ ด้วยไพรเมอร์ F\_*NcoI**mrjp2* และ R\_*SacI**mrjp2*

ทำการโคลนยีน *mrjp2* เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 ซึ่งมี 35S double promoter (ได้จาก Cauliflower Mosaic Virus) ต่อกับ TEV leader sequence (ได้จาก Tobacco Etch Virus) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* จากนั้นจึงตัดชุดยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* และโคลนเข้าพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* เพื่อใช้ในการถ่ายยีนในข้าว

#### 2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสและการชักนำให้เกิดขึ้น

##### 2.1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดแก่มาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือ Clorox เข้มข้น ร้อยละ 10 นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 - 4 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัส บนอาหารสูตร N6 คัดแปลงซึ่งมีการเติมฮอร์โมน 2, 4 - D ภายใต้สภาวะเหมาะสม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

## 2.2. การชักนำให้เกิดต้น

นำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งมีฮอร์โมน NAA และไคนิดินเข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (พิชญภา, 2547)

## 2.3. การชักนำให้เกิดราก

นำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (พิชญภา, 2547)

## 3. การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าว

ทำการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งมีชุดยีนโปรตีนนมผึ้ง จากข้อ 1. โดยใช้วิธีการดัดแปลงจาก Toki (1997) ดังนี้

3.1. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร AB (ภาคผนวก) เป็นเวลา 3 วัน ในที่มีด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.2. ละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียลงในอาหารเหลวสูตร AAM ซึ่งมี acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

3.3. ทำการปลูกเชื้อ (Infection) โดยการแช่แคลลัสลงในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรีย นาน 1 นาที 30 วินาที จากนั้นซับเชื้อส่วนเกินออกด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.4. ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้ออะโกรแบคทีเรียและแคลลัส บนอาหารแข็งสูตร AS (ภาคผนวก) เป็นเวลา 3 วัน ในที่มีด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.5. ทำการล้างเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกด้วยน้ำกลั่น และอาหารเหลวสูตร N6 ซึ่งมีสารละลายไทเมนทิน (Timentin) เข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.6. คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งมีปริมาณยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซินที่เหมาะสม เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงทำการชักนำให้เกิดต้นต่อไป

## 4. การตรวจสอบการถ่ายยีนในแคลลัส

4.1. ทำการตรวจสอบการได้รับยีน โดยอาศัยการแสดงออกของยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซิน (ยีน *hptII*) โดยสังเกตความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไฮโครมัยซิน

4.2. จากนั้นคัดเลือกแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Huang et al. (2000) และตรวจสอบการแทรกตัวของยีนในจีโนมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ F\_hptII-1 และ R\_hptII-1 ซึ่งจำเพาะกับยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และไพรเมอร์ F1\_mrjp2 และ R1\_mrjp2 ซึ่งจำเพาะกับยีนโปรตีนนมผึ้ง โดยมีปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

#### 4.2.1. การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น
10X PCR Buffer - MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, USA)	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, USA)	2.0 mM
2.5 mM dNTPs mix (Fermentas, USA)	200 μM
10 μM F_hptII – 1 primer	0.25 μM
10 μM R_hptII – 1 primer	0.25 μM
50U/μl Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA)	2.5 U
DNA Template	200 ng

#### สภาวะในการทำพีซีอาร์

94 °C	3 min	35 รอบ
95 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
20 °C		

#### 4.2.2. การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น
10X PCR Buffer - MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, USA)	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Fermentas, USA)	2.0 mM
2.5 mM dNTPs mix (Fermentas, USA)	200 μM
10 μM F1_mrjp2 primer	0.25 μM
10 μM R1_mrjp2 primer	0.25 μM
50U/μl Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA)	2.5 U
DNA Template	200 ng

### สถานะในการทำพีซีอาร์

94 °C	3 min	35 รอบ
95 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
20 °C		

#### 5. การตรวจสอบการได้รับยีน และการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในต้นข้าว

##### 5.1. การแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase (*gus*)

ใช้เทคนิค GUS assay (Jefferson, 1987) โดยการตัดใบข้าวมาบ่มในสารละลาย X - gluc (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl glucuronide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกิดสารสีฟ้า

##### 5.2. การแทรกตัวของยีนในจีโนม

ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย mCTAB (Huang et al., 2000) จากใบข้าวแล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F1\_*mrjp2* และ R1\_*mrjp2* ซึ่งจำเพาะกับยีนโปรตีนนมผึ้ง

##### 5.3. การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด ด้วย Master Pure™ RNA Purification kit (EPICENTRE, USA) จากใบข้าวและเมล็ดอ่อน แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse transcriptase PCR (RT - PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ F1\_*mrjp2* และ R1\_*mrjp2* ซึ่งจำเพาะกับยีนโปรตีนนมผึ้ง

##### 5.4. การแสดงออกของยีนระดับโปรตีน โดยใช้เทคนิค SDS - PAGE และ Western blot

ทำการสกัดโปรตีนทั้งหมด ด้วย Protein Extraction Buffer (25 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl) จากใบข้าว เมล็ดอ่อน และเมล็ดแก่ แล้วตรวจสอบลักษณะโปรตีนด้วยเทคนิค SDS - PAGE โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจล เข้มข้น ร้อยละ 10 (Sambrook et al., 2000) และตรวจสอบโปรตีนนมผึ้งด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Penta His™ HRP conjugate kit (QIAGEN, USA) และ Super Signal West His Probe™ kit (PIERCE, USA)

6. การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรม กับข้าวปกติ

ทำการปลูกข้าวดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น  $T_0$  ที่ได้ในโรงเรือน แล้วทำการเปรียบเทียบลักษณะ สัณฐานวิทยา ดังนี้

- 6.1. ความสูงต้น โดยการวัดในหน่วยเซนติเมตร
- 6.2. จำนวนกอดีต้น โดยการนับจำนวนกอ
- 6.3. วันออกดอก โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า
- 6.4. จำนวนช่อดอก โดยการนับจำนวนช่อดอก
- 6.5. จำนวนรวง โดยการนับจำนวนรวง
- 6.6. จำนวนเมล็ดต่อรวง โดยการนับจำนวนเมล็ดในแต่ละรวง
- 6.7. น้ำหนักเมล็ด โดยการชั่งน้ำหนักเมล็ดด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง หลังการอบที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน
- 6.8. ปริมาณโปรตีนในเมล็ดทั้งหมด โดยวิธีการของ Braddford (1976)
- 6.9. ร้อยละของโปรตีนในเมล็ด โดยการคำนวณจากค่าน้ำหนักเมล็ดและปริมาณโปรตีนในเมล็ด (ภาคผนวก)

#### สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. โรงเรือนกระจก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

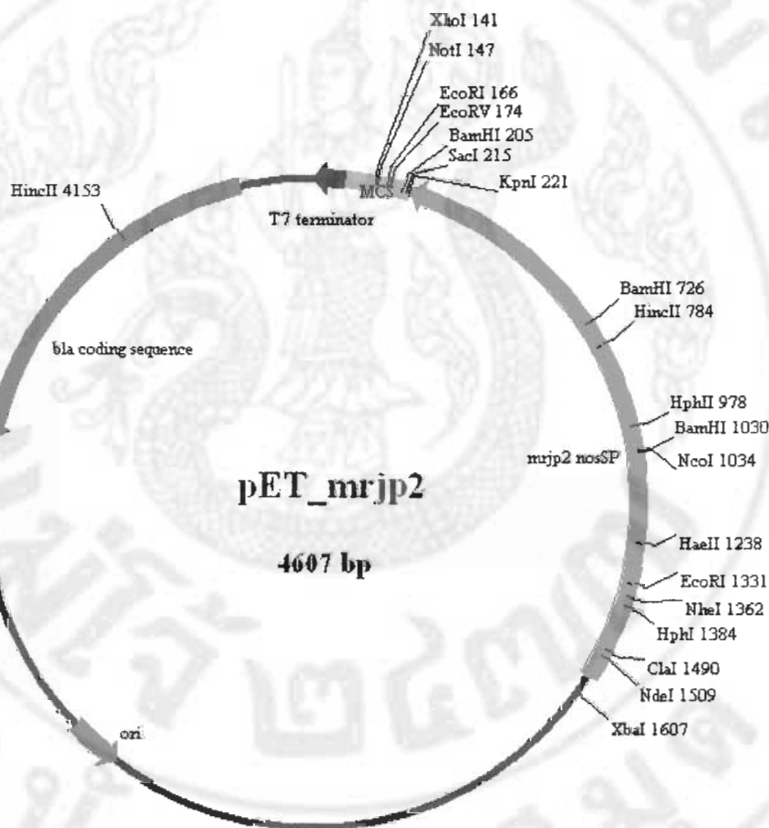
#### ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

11 ตุลาคม 2549 – 31 มีนาคม 2551

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้ง (major royal jelly protein 2 gene: *mrjp2*; Accession no. AF525777) ซึ่งแยกได้จากผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*) โดยถูกโคลนไว้ที่ตำแหน่ง *KpnI* และ *NheI* ของพลาสมิด pET17b อยู่ในพลาสมิด pET\_ *mrjp2* (ภาพ 5)



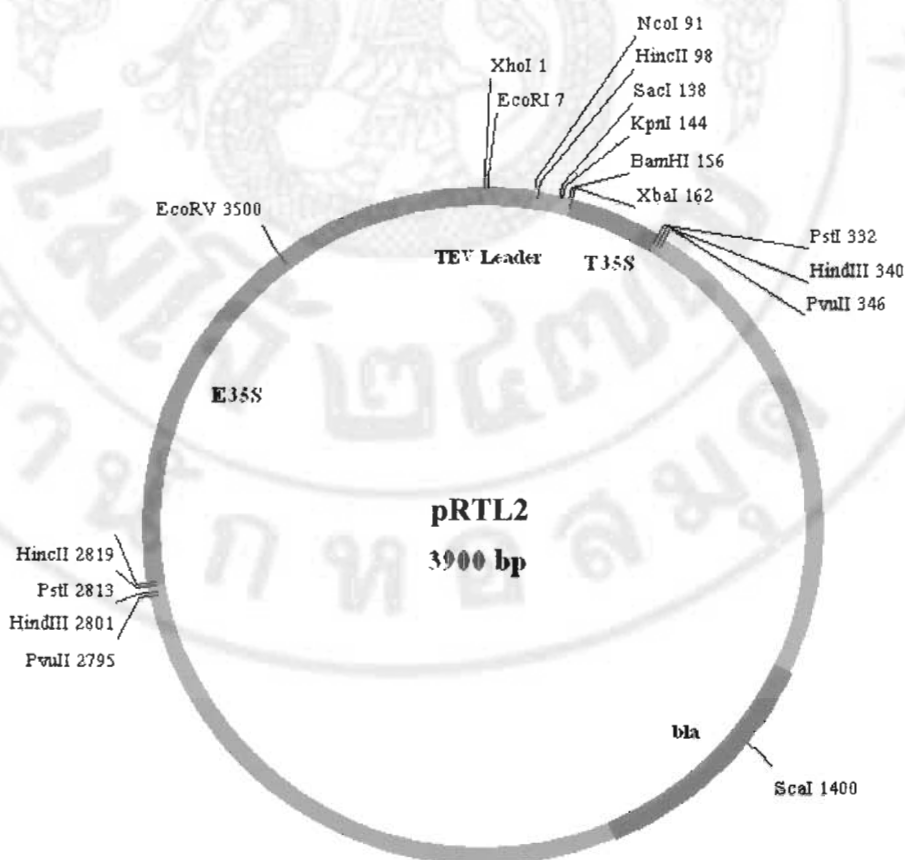
ภาพ 5 แผนที่พลาสมิด pET\_ *mrjp2*

ในการทดลองต้องการให้ยีน *mrjp2* มีการแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S dual enhancer และเทอร์มิเนเตอร์ 35S เพื่อให้มีการแสดงออกอย่างรวดเร็วก่อนเวลาภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชทุกชนิด จึงได้ทำการโคลนเข้าไปยังพลาสมิด pRTL2 เพื่อสร้างชุดของยีน *mrjp2* (cassette of *mrjp2* gene) และโคลนชุดยีนนี้เข้าไปยังพลาสมิดซึ่งใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าวต่อไป

## การสร้างชุดยีน *mrjp2* สำหรับใช้ในการถ่ายยีนในข้าว

### 1. การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2

พลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 (ภาพ 6) ซึ่งมี 35S dual enhancer promoter (ได้จาก Cauliflower Mosaic Virus) ทำให้เกิดการแสดงออกอย่างสูงตลอดเวลาในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งต่อกับ TEV leader sequence (ได้จาก Tobacco Etch Virus) ช่วยส่งเสริมการแสดงออกของยีนในระดับสูง (Ofoghi et al., 2005) โดยทำการถ่ายพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 เข้าไปในเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ Chemical Transformation แล้วคัดเลือกโคลนที่ได้มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดตามแผนที่พลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วจึงตัดพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* เพื่อเตรียมเป็นเวกเตอร์ และทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอล (Ethanol precipitation)

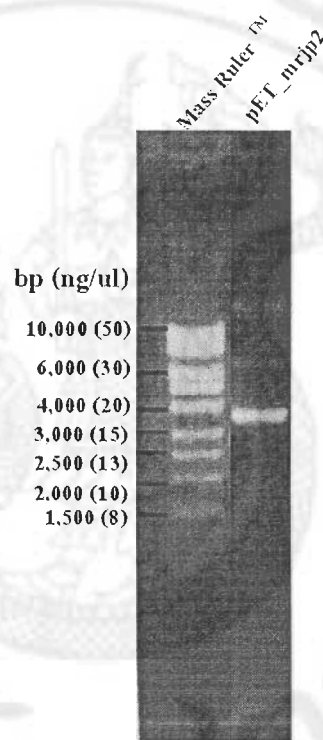


ภาพ 6 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2



## 2. การเตรียมยีน *mrjp2* จากพลาสมิด pET\_*mrjp2*

การเตรียมยีน *mrjp2* ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pET\_*mrjp2* โดยทำการถ่ายพลาสมิด pET\_*mrjp2* เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ Chemical Transformation แล้วคัดเลือกโคลนที่ได้มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB แล้วประมาณความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้วุ้นอะกาโรส (agarose) เข้มข้นร้อยละ 1 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน MassRuler™ DNA Ladder, High Range (Fermentas, USA) ได้พลาสมิดเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพ 7)

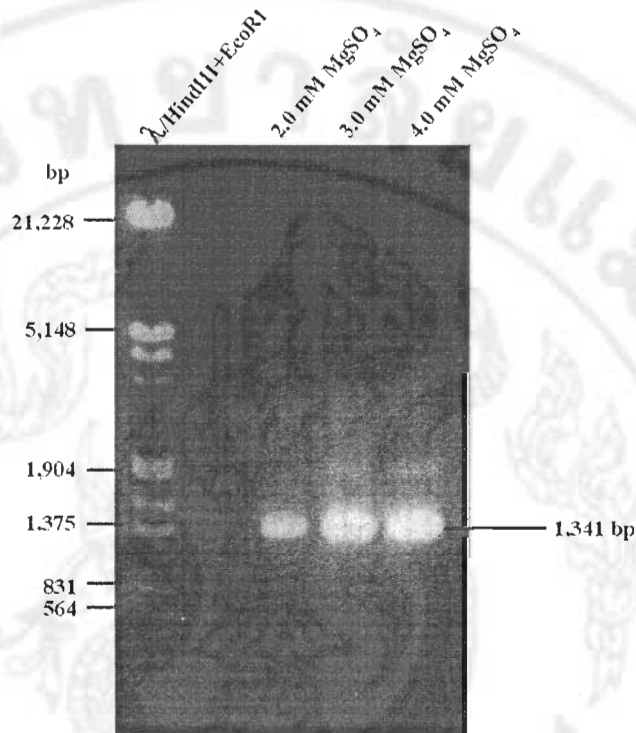


หมายเหตุ: MassRuler™ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน MassRuler™ DNA Ladder, High Range  
pET\_*mrjp2* คือ พลาสมิด pET\_*mrjp2*

ภาพ 7 การประมาณความเข้มข้นของพลาสมิด pET\_*mrjp2* เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน MassRuler™ DNA Ladder, High Range

ในการเตรียมยีน *mrjp2* ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *mrjp2* โดยใช้ไพรเมอร์ (primers) F\_*NcoI**mrjp2* และ R\_*SacI**mrjp2* ซึ่งมีการเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* บริเวณปลาย 5' และ 3' ของดีเอ็นเอ ตามลำดับ และใช้สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) เข้มข้น 2, 3 และ 4 มิลลิโมลาร์ ในการเพิ่มปริมาณ

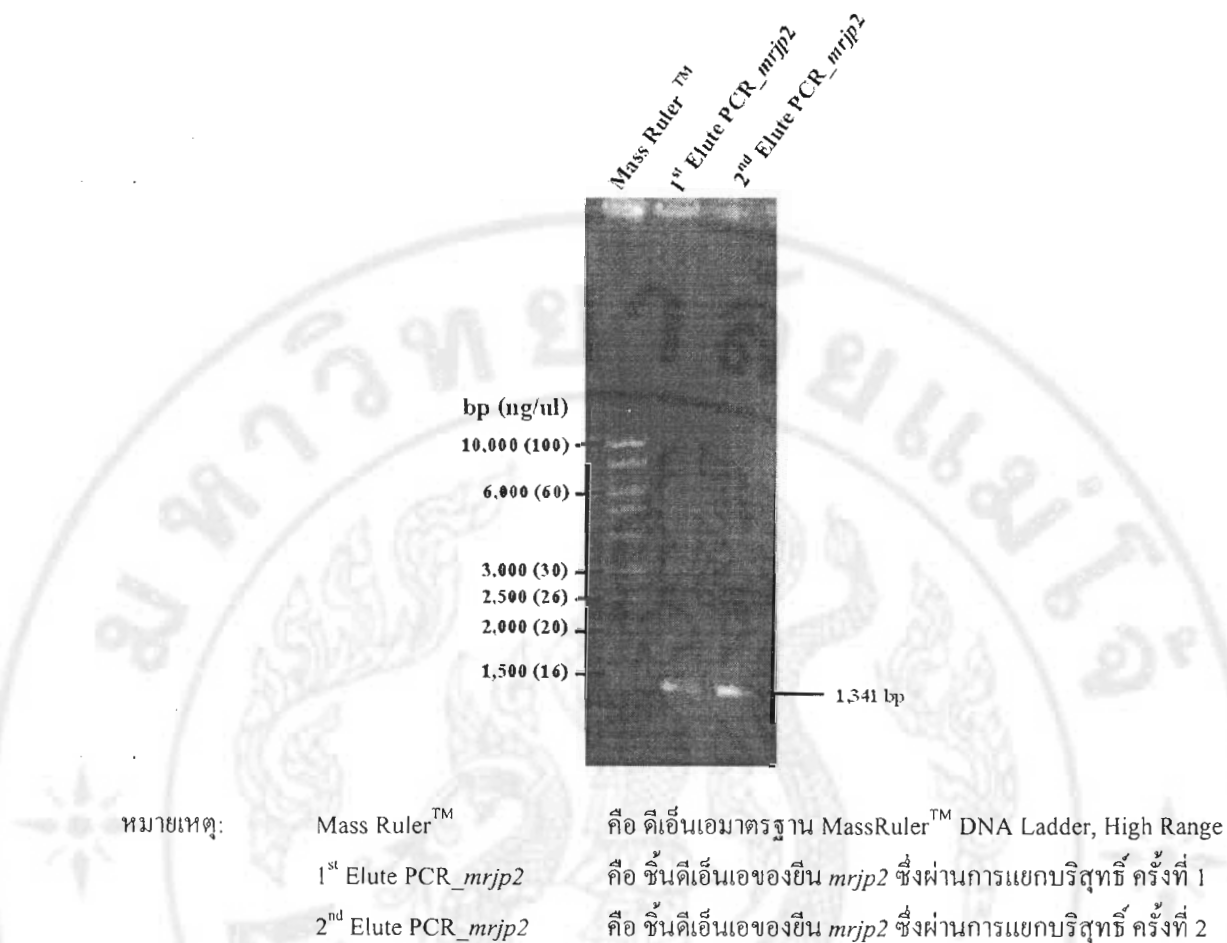
ชั้นยีน *mrjp2* พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตทั้ง 3 ระดับ สามารถเพิ่มปริมาณชั้นยีน *mrjp2* ได้ โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาดประมาณ 1,341 คู่เบส โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมากที่สุด โดยไม่เกิด non – specific product (ภาพ 8)



หมายเหตุ:	$\lambda$ /HindIII + EcoRI	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda$ ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI
	2.0 mM MgSO <sub>4</sub>	คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ MgSO <sub>4</sub> เข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์
	3.0 mM MgSO <sub>4</sub>	คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ MgSO <sub>4</sub> เข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์
	4.0 mM MgSO <sub>4</sub>	คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ MgSO <sub>4</sub> เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์

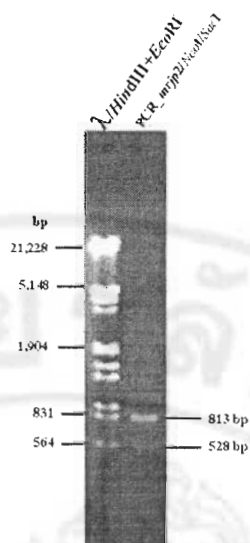
ภาพ 8 การหาปริมาณความเข้มข้นของ MgSO<sub>4</sub> ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *mrjp2* จากพลาสมิด pET\_ *mrjp2* โดยวิธีพีซีอาร์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีน *mrjp2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ยีน *mrjp2* โดยใช้ QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA) ได้ปริมาณดีเอ็นเอเข้มข้น 350 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพ 9)



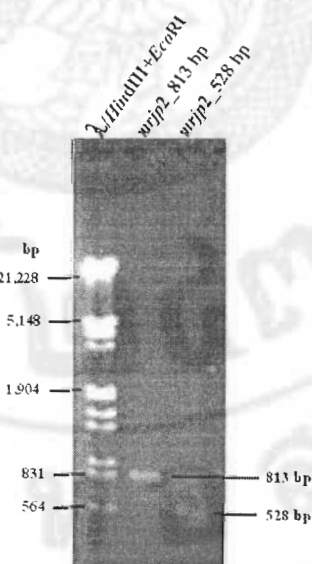
ภาพ 9 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *mrjp2* ที่แยกบริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit

เมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* จะได้ชิ้นยีน *mrjp2* ขนาด 528 และ 813 คู่เบส (ภาพ 10) เนื่องจากยีน *mrjp2* มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *NcoI* ภายในยีน (ภาพ 5) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีน *mrjp2* ทั้ง 2 ชิ้น โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ด้วย QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, USA) เพื่อใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 (ภาพ 11)



หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
 PCR\_mrjp2/NcoI/SacI คือ ยีน *mrjp2* (ได้จากการทำพีซีอาร์) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI

ภาพ 10 ผลการตัดยีน *mrjp2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ Sac I



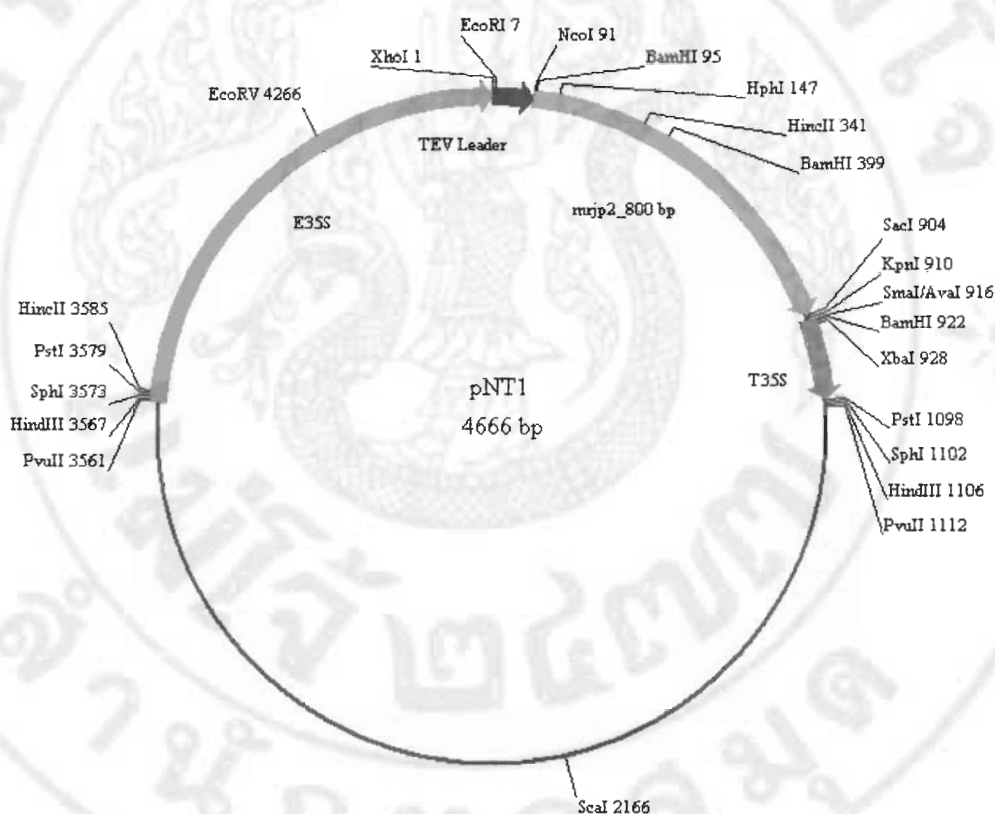
หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
*mrjp2\_813 bp* คือ ชิ้นยีน *mrjp2* ขนาด 813 คู่เบส (ชิ้นที่ 1)  
*mrjp2\_528 bp* คือ ชิ้นยีน *mrjp2* ขนาด 528 คู่เบส (ชิ้นที่ 2)

ภาพ 11 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอของยีน *mrjp2* ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI โดยใช้ QIAquick gel extraction kit

### 3. การสร้างชุดยีน *mrjp2*

#### 3.1. การสร้างและคัดเลือกพลาสมิด pNT1

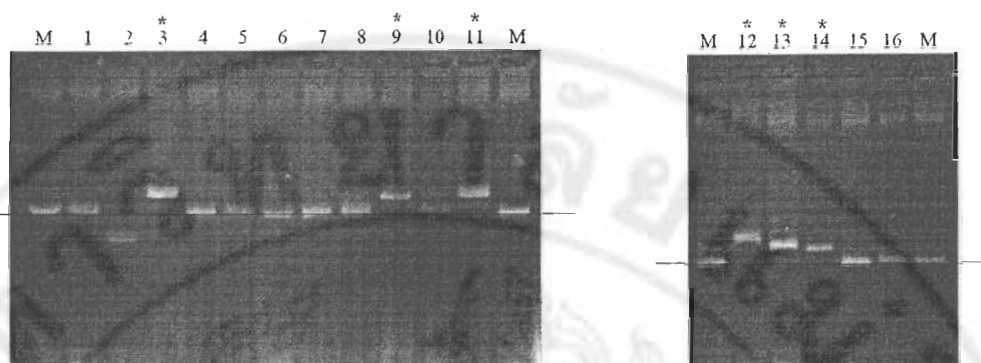
ทำการเชื่อมชิ้นยีน *mrjp2* ขนาด 813 คู่เบส ซึ่งมีปลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* เช่นเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ T4 Ligase (NEB, USA) ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เป็นพลาสมิด pNT1 (ภาพ 12) แล้วทำการถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  และเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง



ภาพ 12 แผนที่พลาสมิด pNT1

หลังการถ่ายฝากพลาสมิด pNT1 พบว่ามีโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งคาดว่าได้รับพลาสมิด pNT1 จำนวน 16 โคลน จึงทำการคัดเลือกโคลนหรือโคลนที่ได้รับพลาสมิดด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ซึ่งมีพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 พบว่ามีโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่คาดว่า

ได้รับพลาสมิด pNT1 ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 เดิม จำนวน 6 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 3, 9, 11, 12, 13 และ 14 (ภาพ 13)



หมายเหตุ: M คือ โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2  
 1 – 16 คือ โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2  
 โคลนที่ 1 – 16

**ภาพ 13** การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pNT1 ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2

ทำการตรวจสอบโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่คัดเลือกได้ โดยการสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะตามแผนที่พลาสมิด pNT1 (ภาพ 12) ในการทดลองได้เลือกตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์จำนวน 3 ปฏิกริยา ได้แก่

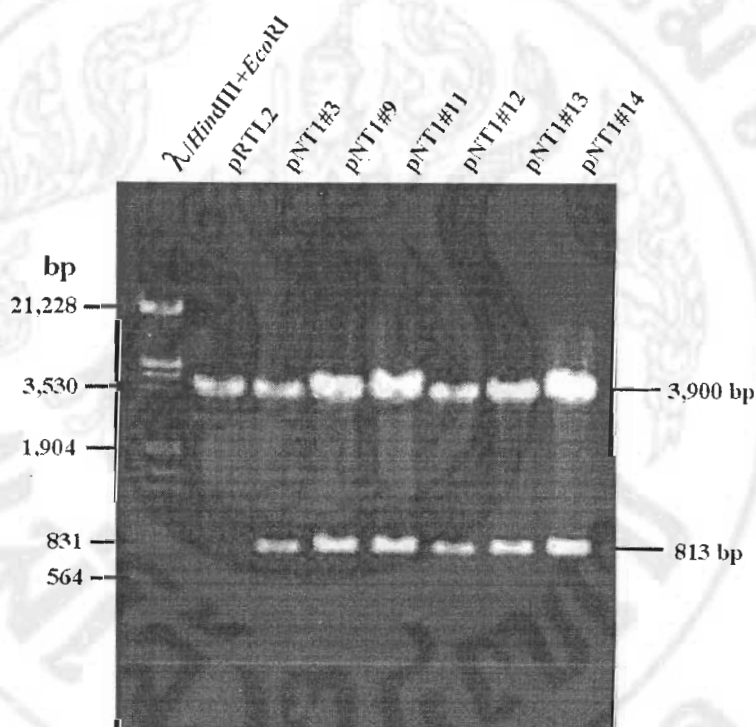
3.1.1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 813 คู่เบส (ยีน *mrjp2* ขนาด 813 คู่เบส) และดีเอ็นเอขนาด 3,900 คู่เบส (พลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2)

3.1.2. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 304, 518 และ 3,744 คู่เบส

3.1.3. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Sac*I คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 891 คู่เบส (ส่วนของยีน *mrjp2*) และดีเอ็นเอขนาด 3,769 คู่เบส (ส่วนของพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2)

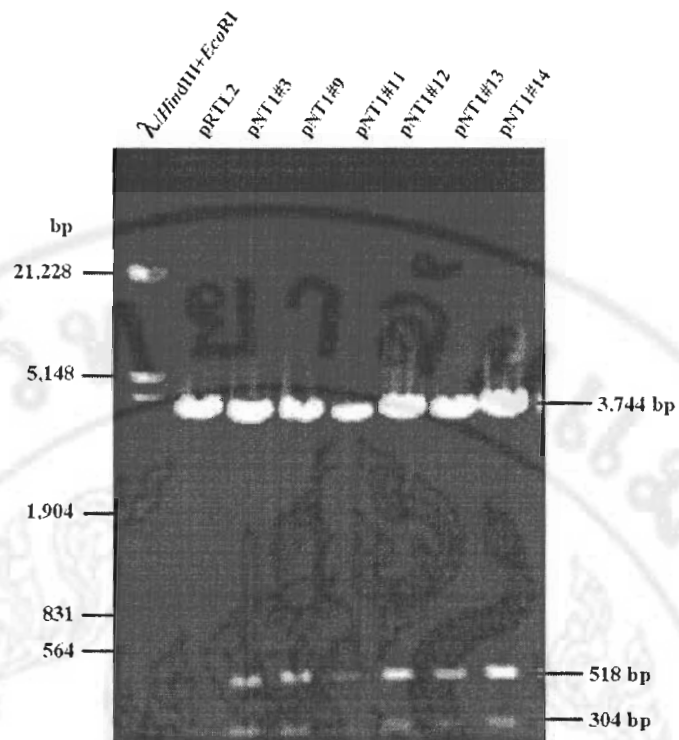
จากการตรวจสอบพลาสมิดจากโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 6 โคลนที่ได้แล้ว แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้วุ้นอะกาโรส เข้มข้นร้อยละ 1

พบว่า พลาสมิด pNT1 ทั้ง 6 โคลน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 813 และ 3,900 คู่เบส (ภาพ 14) เมื่อตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 304, 518 และ 3,744 คู่เบส (ภาพ 15) และเมื่อตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *SacI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 891 และ 3,769 คู่เบส (ภาพ 16) แสดงว่า พลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลน มีขนาดของชิ้น DNA ตามที่คาดไว้ ในขณะที่พลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว แสดงว่า โคลนทั้ง 6 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 3, 9, 11, 12, 13 และ 14 ได้รับชิ้นยีน *mrjp2* ขนาด 813 คู่เบส ดังนั้นจึงสามารถใช้พลาสมิดลูกผสม pNT1 ในการทดลองต่อไป



หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRI*  
 pRTL2 คือ พลาสมิด pRTL2  
 pNT1#3 - 14 คือ พลาสมิด pNT1 ที่ได้จากโคลนที่ 3 - 14

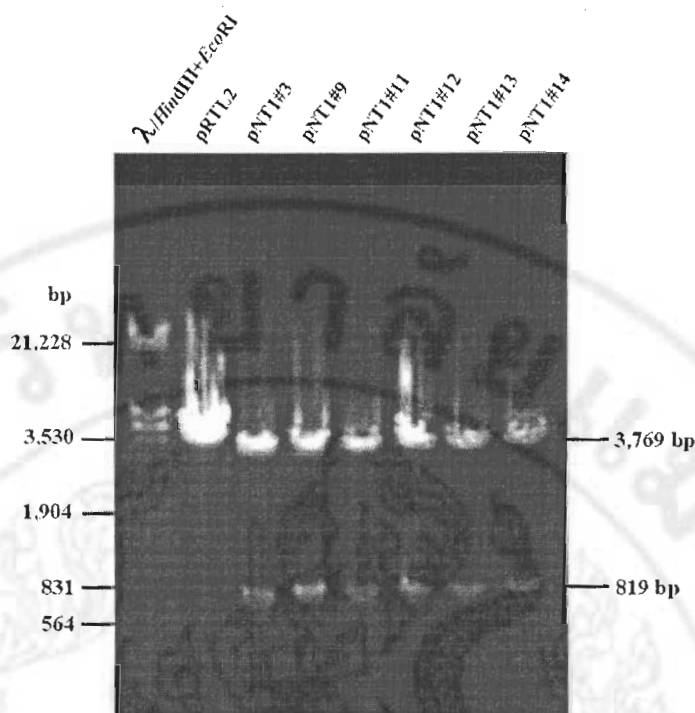
ภาพ 14 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* เปรียบเทียบกับพลาสมิด pRTL2



หมายเหตุ:  $\lambda$ HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
 pRTL2 คือ พลาสมิด pRTL2  
 pNT1#3 - 14 คือ พลาสมิด pNT1 ที่ได้จากโคลนที่ 3 - 14

ภาพ 15 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI



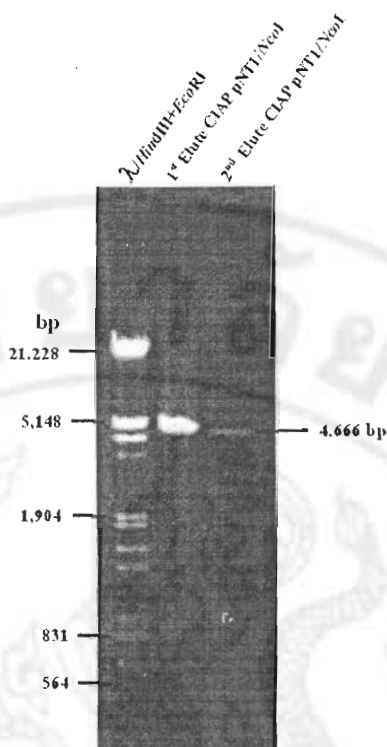


หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
 pRTL2 คือ พลาสมิด pRTL2  
 pNT1#3 - 14 คือ พลาสมิด pNT1 ที่ได้จากโคลนที่ 3 - 14

ภาพ 16 การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ที่สกัดได้จากทั้ง 6 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ SacI

### 3.2. การสร้างและคัดเลือกพลาสมิด pNT2

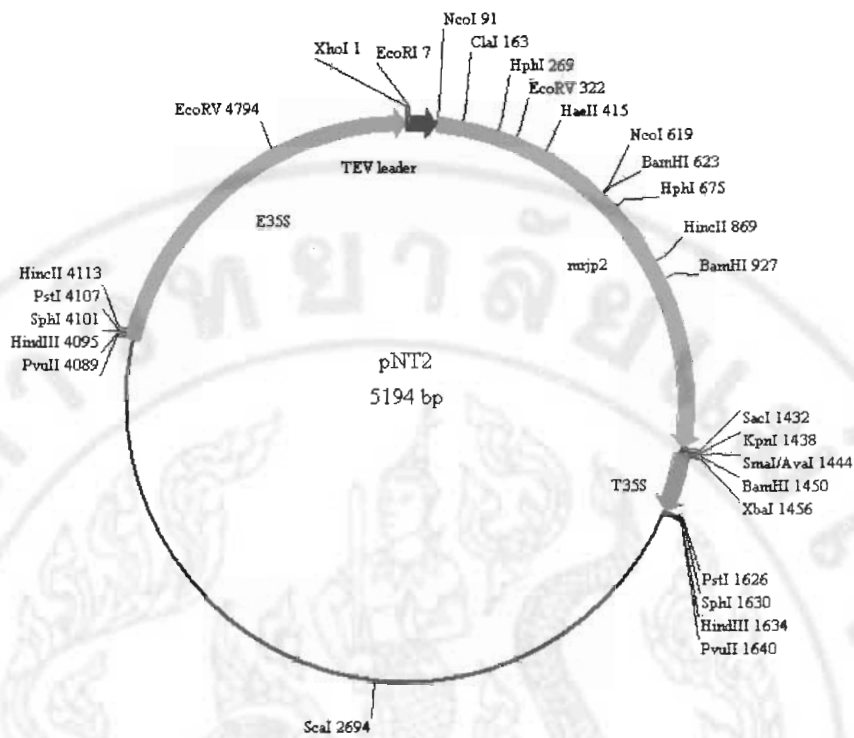
เพื่อสร้างพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *mrjp2* ที่สมบูรณ์ จะต้องทำการเชื่อมชิ้นส่วนของยีน *mrjp2* ขนาด 528 คู่เบสเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pNT1 ซึ่งมีชิ้นส่วนยีน *mrjp2* ส่วนแรกขนาด 813 คู่เบส จึงได้ทำการตัดพลาสมิดเวกเตอร์ pNT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* แล้วดึงหมู่ออสเฟตที่ปลาย 5' ของชิ้นดีเอ็นเอออกด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP; NEB, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที เพื่อลดปัญหาซึ่งอาจเกิดจากพลาสมิดเวกเตอร์สามารถกลับมาเชื่อมกันเป็นพลาสมิด pNT1 ได้อย่างเดิม แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (QIAGEN, USA) ได้ปริมาณเอ็นเอ เข้มข้น 220.56 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพ 17)



- หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI
- 1<sup>st</sup> Elute CIAP pNT1/NcoI คือ พลาสมิด pNT1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI แล้วคั้งหมู่ฟอสเฟตที่ปลายออก ซึ่งผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วชะออกจากคอลัมน์ ครั้งที่ 1
- 2<sup>nd</sup> Elute CIAP pNT1/NcoI คือ พลาสมิด pNT1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI แล้วคั้งหมู่ฟอสเฟตที่ปลายออก ซึ่งผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วชะออกจากคอลัมน์ ครั้งที่ 2

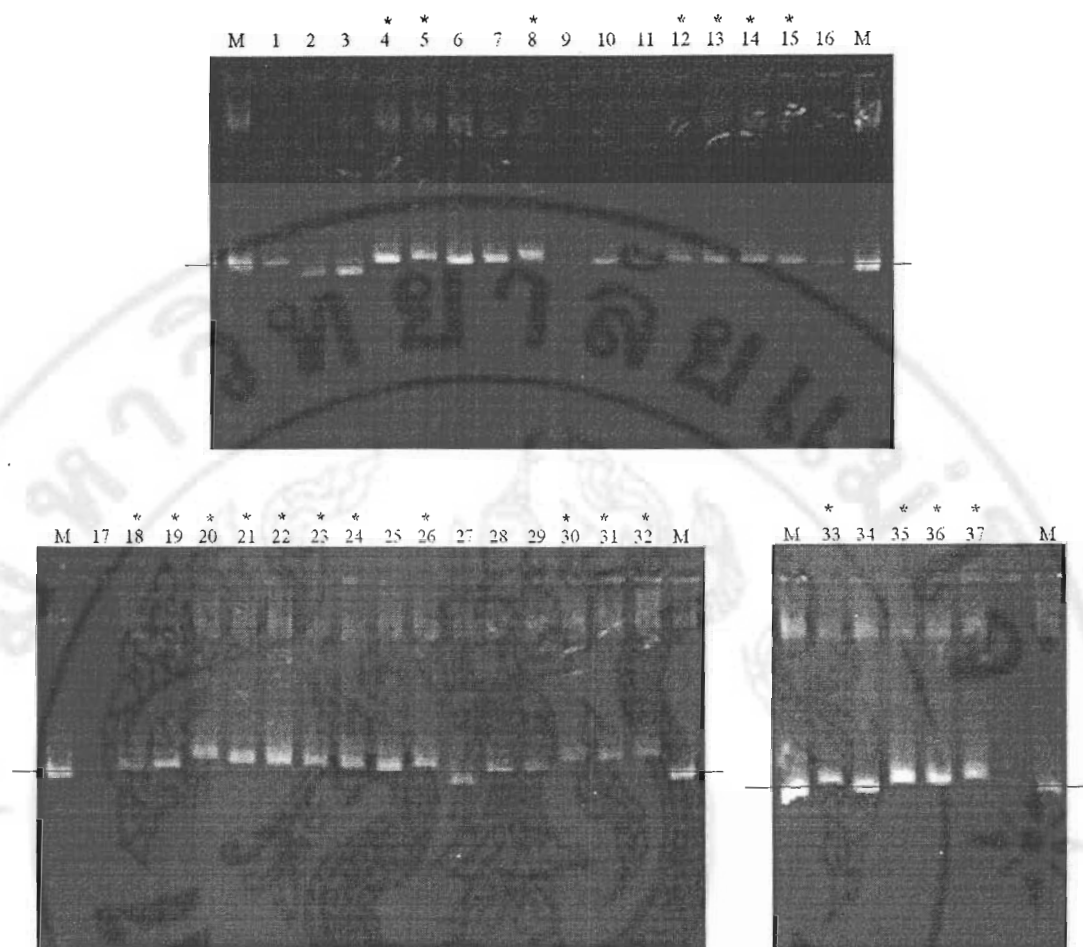
**ภาพ 17** การตรวจสอบพลาสมิด pNT1 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI แล้วคั้งหมู่ฟอสเฟตออกด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase และผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit

จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นยีน *mrj*p2 ขนาด 528 คู่เบส (ภาพ 11) ซึ่งมีปลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pNT1 ที่เตรียมไว้ด้วยเอนไซม์ T4 Ligase (NEB, USA) ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เป็นพลาสมิด pNT2 (ภาพ 18) แล้วทำการถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  และเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง



ภาพ 18 แผนที่พลาสมิด pNT2

หลังการถ่ายฝากพลาสมิด pNT2 พบว่ามีโคลนหนึ่งของแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งคาดว่าได้รับพลาสมิด pNT2 จำนวน 45 โคลน ซึ่งทำการคัดเลือกโคลนหรือโคลนที่ได้รับพลาสมิด ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ซึ่งมีพลาสมิดเวกเตอร์ pNT1 พบว่ามีโคลนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pNT2 จำนวน 23 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 5, 8, 10, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 30, 31, 33, 35, 36 และ 37 (ภาพ 19)



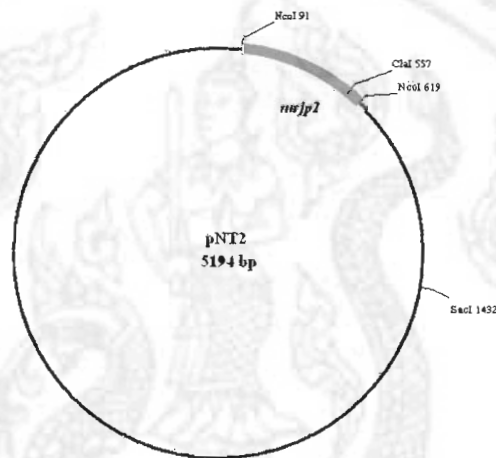
หมายเหตุ: M คือ โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pNT1  
 1 – 37 คือ โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pNT2 โคลนที่ 1 – 37

**ภาพ 19** การคัดเลือกโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pNT2 ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pNT1

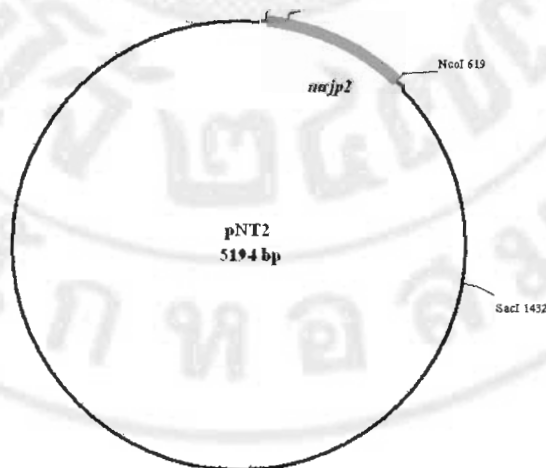
ทำการตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด pNT2 ที่ได้ เนื่องจากมีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงเอนไซม์เดียว ในการเชื่อมซันดิเอ็นเอ ทำให้มีโอกาสที่ยีนจะเข้าเชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ได้ 2 แบบ (ภาพ 20) โดยการสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเลือกชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะตามแผนผังของพลาสมิด pNT2 (ภาพ 18) จากการทดลองได้เลือกตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์จำนวน 2 ปฏิกริยา ได้แก่

3.2.1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* เพื่อตรวจสอบการได้รับยีน โดยคาดว่า จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 528 คู่เบส (ยีน *mrjp2* ขนาด 528 คู่เบส) และดีเอ็นเอขนาด 4,666 คู่เบส (พลาสมิด pNT1)

3.2.2. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ClaI* และ *SacI* เพื่อตรวจสอบทิศทางการเข้า เชื่อมกันของยีน ซึ่งหากได้รับยีนถูกทิศทางจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,269 และ 3,925 คู่เบส แต่หาก ได้รับยีนผิดทิศทาง จะได้ดีเอ็นเอขนาด 885 และ 4,309 คู่เบส (ภาพ 20)



ก) ถูกทิศทาง



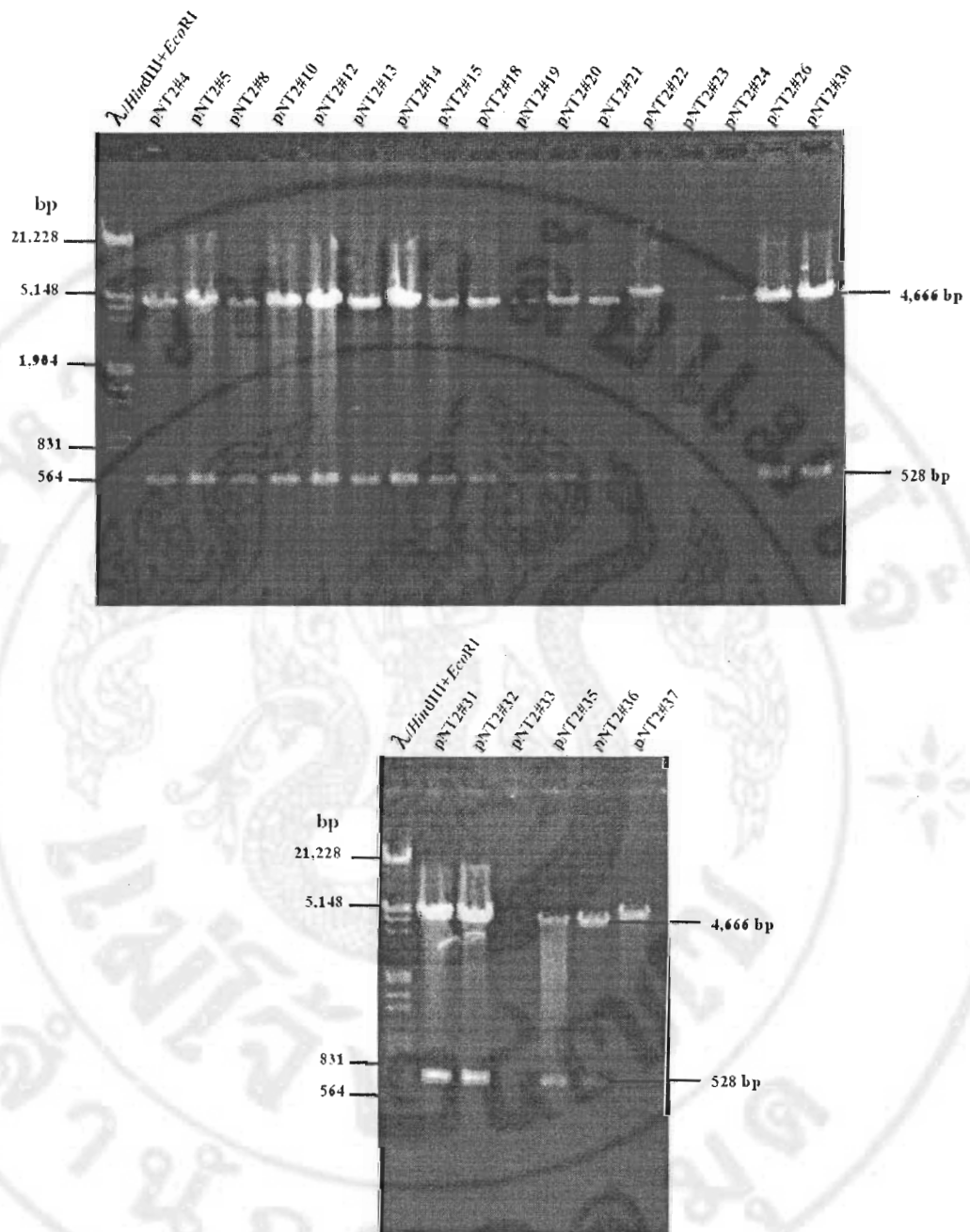
ข) ผิดทิศทาง

ภาพ 20 การเข้าเชื่อมกันของยีน *mrjp2* ขนาด 528 คู่เบสในพลาสมิด pNT2

ก) พลาสมิด pNT2 ซึ่งมียีน *mrjp2* เข้าแทรกถูกทิศทาง

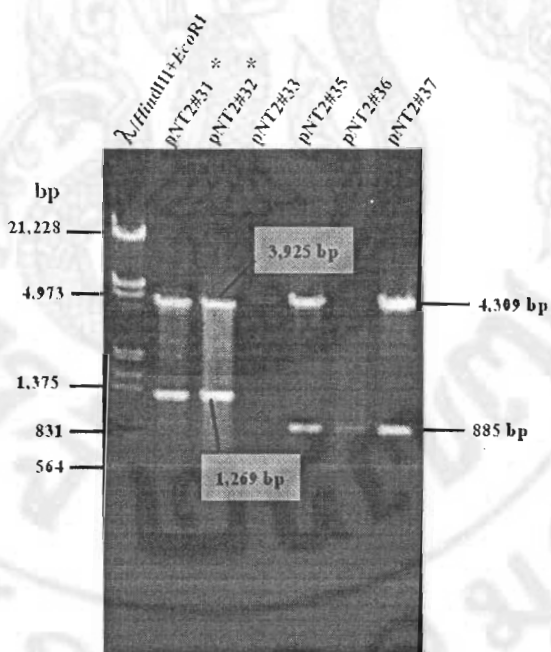
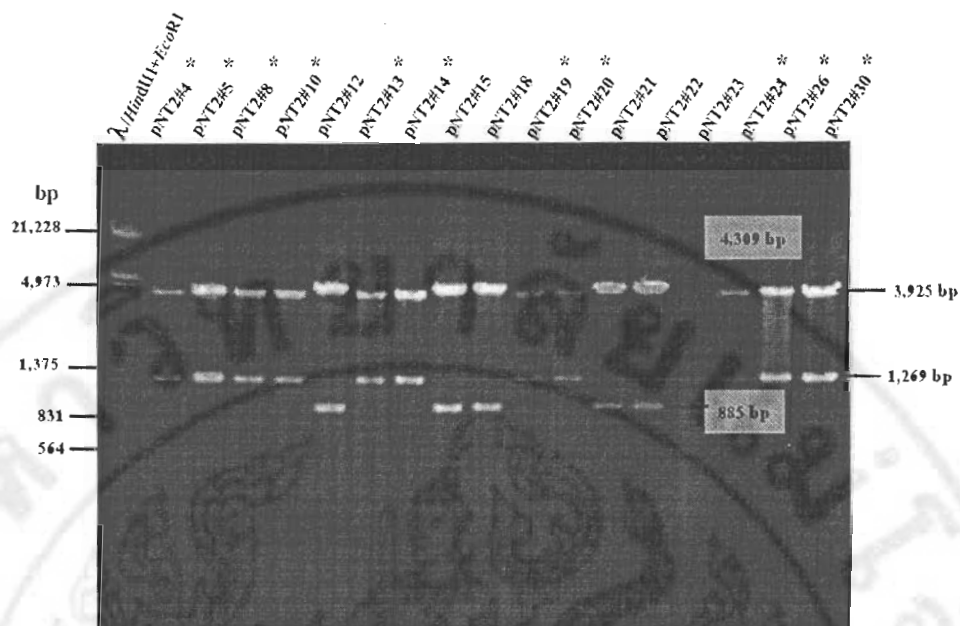
ข) พลาสมิด pNT2 ซึ่งมียีน *mrjp2* เข้าแทรกผิดทิศทาง

จากการตรวจสอบพลาสมิด pNT2 จำนวน 23 โคลน ที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้รู้อะกาโรส เข้มข้นร้อยละ 1 พบว่า พลาสมิด pNT2 โคลนที่ 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 30, 31, 35 และ 36 หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 528 คู่เบส ดังที่คาดไว้ (ภาพ 21) จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องในการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอด้วยการตัดพลาสมิด pNT2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ClaI* และ *SacI* พบว่ามีพลาสมิดจำนวน 13 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 4, 5, 8, 10, 13, 14, 19, 20, 24, 26, 30, 31 และ 32 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,269 และ 3,925 คู่เบส ซึ่งตรงตามที่คาดไว้เมื่อขึ้นยีน *mrj2* ขนาด 528 คู่เบส เข้าเชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ pNT1 ได้อย่างถูกต้อง ในขณะที่พลาสมิดจำนวน 7 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 12, 15, 18, 21, 23, 35 และ 36 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 885 และ 4,309 คู่เบส ซึ่งไม่ถูกต้องตามที่คาดไว้ (ภาพ 22)



หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
 pRTL2 คือ พลาสมิด pRTL2  
 pNT1#3 - 14 คือ พลาสมิด pNT1 ที่ได้จากโคลนที่ 3 - 14

ภาพ 21 การตรวจสอบพลาสมิด pNT2 ที่สกัดได้จากทั้ง 23 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI



หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
 pRTL2 คือ พลาสมิด pRTL2  
 pNTI#3 - 14 คือ พลาสมิด pNTI ที่ได้จากโคลนที่ 3 - 14

ภาพ 22 การตรวจสอบพลาสมิด pNT2 ที่สกัดได้จากทั้ง 23 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ClaI และ SacI



#### 4. การตรวจสอบยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pNT2

การโคลนยีน *mrjp2* เข้าไปในพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 โดยจะได้ชุดยีนซึ่งประกอบด้วย 35S dual enhancer promoter, TEV leader, ยีน *mrjp2* และ 35S terminator ได้มีการเพิ่มปริมาณยีน *mrjp2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยให้มีบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* ที่ปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ นอกจากนี้ด้านปลาย 5' ของยีน *mrjp2* ยังมีลำดับเบสของ Histidine tag (6X His – tag) ซึ่งใช้ในการตรวจสอบทางชีวโมเลกุลและการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อให้ยีน *mrjp2* มีลำดับเบสและเกิดการแสดงออกอย่างถูกต้อง จึงต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอ (sequence) ด้วยวิธีการหาลำดับเบส (DNA sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ F1\_ *mrjp2*, F\_ *mrjp2*, R\_ *mrjp2*, *mrjp2*Seq5' และ *mrjp2*Seq3' โดยหน่วยบริการชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) แล้วสร้าง contig ของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pNT2 ที่หาลำดับเบสได้ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบส และแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับยีน *mrjp2* ซึ่งมีฐานข้อมูลใน GeneBank ด้วยโปรแกรม ClustalX

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสแล้ว พบว่า Contig ของยีน *mrjp2* (ภาพ 23) มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction site) *NcoI* และ *SacI* อยู่ที่ปลายด้าน 5' และ 3' ที่ตำแหน่ง 339 และ 1,732 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีบริเวณ Histidine tag (6X His – tag) ที่ตำแหน่ง 351 โดยที่มีบริเวณในการเริ่มแปลรหัส (Start codon: ATG) และบริเวณหยุดการแปลรหัส (Stop codon: TAG) ที่ตำแหน่ง 342 และ 1,708 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน *mrjp2* ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่า Contig ของยีน *mrjp2* มีลำดับเบสแตกต่างกับยีน *mrjp2* ในฐานข้อมูลที่ตำแหน่ง 438 และ 492 (ภาพ 24) ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *mrjp2* ที่อยู่ในพลาสมิด pET\_ *mrjp2* เมื่อแปลรหัส Contig ของยีน *mrjp2* เป็นกรดอะมิโนแล้ว ทำการเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่า มีลำดับกรดอะมิโนตรงกันทั้งหมด (ภาพ 25)

```

1      ATGCCTCTGC CGCAGTGGTC CCAAAGATGG ACCCCACCC ACGAGGAGCA
51     TCGTGGAAAA AGAAGACGTT CCAACCACGT CTTCAAAGCA AGTGGATTGA
101    TGTGATATCT CCACTGACGT AAGGGATGAC GCACAATCCC ACTATCCTTC
151    GCAAGACCTT TCCTCTATAT AAGGGAAGTT CATTTCATTT GGAGAGGACC
201    TCGAGAATTC TCAACACAAC ATATACAAAA CAAACGAATC TCAAGCAATC
251    AAGCATTCTA CTTCTATTGC AGCAATTTAA ATCATTTCCTT TTAAGCAAAA
301    AGCAATTTTC TGAATAATTT CACCATTTAC GAACGATAGC CAEGGCTAGC
351    CATCATCATC ATCATCATGC CATTATTCTGA CAAAATTCTG CAAAAAACTT
401    GGAATAATTCG TTGAACGTAA TTCACGAATG GAAATATATC GATTATGATT
451    TCGGTAGCGA AGAAAAGAAG CAAGCTGCGA TTCAATCTGG CGAATACGAT
501    CATACGAAAA ATTATCCCTT CGATGTGCGAT CAATGGCATG ATAAGTACTT
551    TTGTCACCAT ACTAAAGTAC GATGGTGTGC CTTCTACTTT GAACATGATA
601    TCTAACAAAA TCGGTAAGGG TGGACGCCTT CTACAACCAT ATCCTGATTG
651    TTCTGGGGCA GAGAATAAAG ATTGCTCTGG AATCGTGAGC GCTTTCAAAA
701    TTGCGATTGA CAAATTCGAC AGATTGTGGG TTTTGGATTG AGGTCTTATC
751    AATAGAACTG AACCTATATG TGCTCCAAAA TTGCATGTCT TTGATCTGAA
801    AAACACAAAG CACCTTAAGC AAATCGAAAT ACCACATGAT ATTGCCGTAA
851    ATGCCACCAC AGGAAAGGGA GGGCTAGTCT CTCTAGTTGT TCAAGTCATG
901    GATCCTATGA ATACTTTAGT ATACATAGCA GACCATAAGG GTGATGCTTT
951    GATCGTCTAT CAAAATCCG ATGATTCCTT CCATCGAATG ACTTCCAACA
1001   CTTTCGATTA CGATCCAGA TATGCCAAAA TGACGATCAA TGGAGAAAGT
1051   TTCACATTGA AAAATGGAAT TTGTGGAATG GCTCTTAGTC CCGTGACGAA
1101   CAATCTTTAT TACAGTCCTC TCGCTTCTCA CGGTTTGTAT TATGTCAACA
1151   CGGAACCATT TATGAAATCA CAATTFGGAG ACAATAATAA CGTGCAATAT
1201   GAAGGATCCC AAGTACTTTT GAACACGCAA TCATTGGCTA AAGCAGTATC
1251   GAAAGATGGC GTCCTCTTCG TCGGACTTGT GGGTAATTCA GCTCTTGGAT
1301   GCTTGAACGA GCATCAACCA CTTCAGAGAG AAAATTTAGA ACTGCTCGCC
1351   CAAAATGAAA AAACACTTCA AATGATCGCA GGTATGAAAA TTAAGGAAGA
1401   GCTTCCACAT TTCGTAGGAA GTAACAAACC TGTAAGGAC GAATATATGT
1451   TAGTTTTAAG TAACAAAATG CAGAAAATAG TAAATAATGA TTTTAATTTT
1501   AACGACGTAA ACTTCCGAAT TTTGGGTGCG AATGTAAAGG AATTAATGAG
1551   AAATACTCAT TGCGCAAATT TTAACAATAA AAATAATCAG AAGAATAACA
1601   ATCAGAAGAA TAACAATCAG AACAAATAA ATCAGAAGAA TAACAATCAG
1651   AAAAATAACA ATCAGAAGAA TAACAATCAG AAGAATAACA ATCAGAATAC
1701   TAACAATTAG AATGATAATC AATCCGGTAC CGAGCTCGGT ACCCGGGGAT
1751   CCTCTAGAGT CCGCAAAAAT CACCAGTCTC TCTCTACAAA TCTATCTCTC
1801   TCTATTTTTT TCCAGAATAA TGTGTGAGTA GTTCCAGAT AAGGGAATTA
1851   GGGTTCTTAT AGGGTTTCGC TCATGTGTTG AGCATATAAG AAACCCTTAG
1901   TATGTATTTG TATTTGTAAA ATACTTCTAT CAATAAAATT TCTAATTCCT
1951   AAAACCAAAA TCCAGTGACC TGCAGGTCGA CTCTAGAGGA TCCCGGGTA
2001   CCGAGCTCGG NTTCCGNNTC NTGNCNTNGC TGTTCCTGN GNGAATTTG
2051   TNTCCGCTCN C

```

หมายเหตุ: **CCATGG** คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และลำดับที่ขีดเส้นใต้ คือ

บริเวณ start codon

**CATCATCATCATCATCAT** คือ บริเวณ Histidine tag (6x – His tag)

**TAG** คือ บริเวณ stop codon

**GAGCTC** คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI*

ภาพ 23 Contig ของยีน *trj2*

MRJP2 : -----\*-----20-----\*-----40-----\*-----60-----\*-----80----- : 53  
contig\_pNT : ATGGCTAGCCATCATCATCATCATCAT : 80  
GCCATTATTCGACAAAATTCTGCAAAAAACTTGGAAAAATTCGTTGAACGTAAT

MRJP2 : \*-----100-----\*-----120-----\*-----140-----\*-----160----- : 133  
contig\_pNT : TCACGAATGGAAATATATCGATTATGATTTCCGTTAGCGAAGAAAGACAAGCTGCGATTCAATCTGGCGAATACGATC : 160  
TCACGAATGGAAATATATCGATTATGATTTCCGTTAGCGAAGAAAGACAAGCTGCGATTCAATCTGGCGAATACGATC

MRJP2 : \*-----180-----\*-----200-----\*-----220-----\*-----240----- : 213  
contig\_pNT : ATACGAAAAATTATCCCTTCGATGTCGATCAATGGCATGATAAGACTTTTGTCAACCACTAAAGTACGATGGTGTGCT : 240  
ATACGAAAAATTATCCCTTCGATGTCGATCAATGGCATGATAAGACTTTTGTCAACCACTAAAGTACGATGGTGTGCT

MRJP2 : \*-----260-----\*-----280-----\*-----300-----\*-----320----- : 293  
contig\_pNT : TCTACTTTGAACATGATATCTAACAAAATCGGTAAAGGGTGGACGCTTCTACAACCATATCCTGATTGGTCTGGGCAGA : 320  
TCTACTTTGAACATGATATCTAACAAAATCGGTAAAGGGTGGACGCTTCTACAACCATATCCTGATTGGTCTGGGCAGA

MRJP2 : \*-----340-----\*-----360-----\*-----380-----\*-----400----- : 373  
contig\_pNT : GAATAAAGATTGCTCTGGAATCGTGAGCGCTTTCAAATTCGGATTGACAAATTCGACAGATTGTGGGTTTTGGATTGAG : 400  
GAATAAAGATTGCTCTGGAATCGTGAGCGCTTTCAAATTCGGATTGACAAATTCGACAGATTGTGGGTTTTGGATTGAG

MRJP2 : \*-----420-----\*-----440-----\*-----460-----\*-----480----- : 453  
contig\_pNT : GTCTTATCAATAGAAGCTGAACCTATATGTCTCCAAAAGTTGCATGCTTTGATCTGAAAAACACAAAGCACCTTAAGCAA : 480  
GTCTTATCAATAGAAGCTGAACCTATATGTCTCCAAAAGTTGCATGCTTTGATCTGAAAAACACAAAGCACCTTAAGCAA

MRJP2 : \*-----500-----\*-----520-----\*-----540-----\*-----560----- : 533  
contig\_pNT : ATCGAAATACCCATGATATTGCCGTAATGCCACCACAGGAAAGGGAGGGCTAGTCTCTAGTTGTTCAAGCCATGGA : 560  
ATCGAAATACCCATGATATTGCCGTAATGCCACCACAGGAAAGGGAGGGCTAGTCTCTAGTTGTTCAAGCCATGGA

MRJP2 : \*-----580-----\*-----600-----\*-----620-----\*-----640----- : 613  
contig\_pNT : TCCTATGAATACTTTAGTATACATAGCAGACCATAAGGGTGTGCTTTGATCGTCTATCAAATTCGGATGATTCCTTCC : 640  
TCCTATGAATACTTTAGTATACATAGCAGACCATAAGGGTGTGCTTTGATCGTCTATCAAATTCGGATGATTCCTTCC

MRJP2 : \*-----660-----\*-----680-----\*-----700-----\*-----720----- : 693  
contig\_pNT : ATCGAATGACTTCCAACACTTTCGATTACGATCCCAGATATGCCAAAATGACGATCAATGGAGAAAGTTTCACATTGAAA : 720  
ATCGAATGACTTCCAACACTTTCGATTACGATCCCAGATATGCCAAAATGACGATCAATGGAGAAAGTTTCACATTGAAA

MRJP2 : \*-----740-----\*-----760-----\*-----780-----\*-----800----- : 773  
contig\_pNT : AATGGAATTTGTGGAATGGCTCTTAGTCCCGTGACGAAACAATCTTTATTACAGTCTCTCGCTTCTCAGGTTTTGATTA : 800  
AATGGAATTTGTGGAATGGCTCTTAGTCCCGTGACGAAACAATCTTTATTACAGTCTCTCGCTTCTCAGGTTTTGATTA

MRJP2 : \*-----820-----\*-----840-----\*-----860-----\*-----880----- : 853  
contig\_pNT : TGTCAACACGGAACCACTTATGAAATCACAATTTGGAGACAATAAATACGTGCAATATGAAGGATCCCAAGATACTTTGA : 880  
TGTCAACACGGAACCACTTATGAAATCACAATTTGGAGACAATAAATACGTGCAATATGAAGGATCCCAAGATACTTTGA

MRJP2 : \*-----900-----\*-----920-----\*-----940-----\*-----960----- : 933  
contig\_pNT : ACACGCAATCATTGGCTAAAGCAGTATCGAAAGATGGCGTCTCTCTCGTGGACTTCTGGTAAATTCAGCTCTGGATGC : 960  
ACACGCAATCATTGGCTAAAGCAGTATCGAAAGATGGCGTCTCTCTCGTGGACTTCTGGTAAATTCAGCTCTGGATGC

MRJP2 : \*-----980-----\*-----1000-----\*-----1020-----\*-----1040----- : 1013  
contig\_pNT : TTGAACGAGCATCAACCACTTCAGAGAGAAAATTTAGAAGCTGGTCCGCCAAAATGAAAAACACTTCAAATGATCGCAGG : 1040  
TTGAACGAGCATCAACCACTTCAGAGAGAAAATTTAGAAGCTGGTCCGCCAAAATGAAAAACACTTCAAATGATCGCAGG

MRJP2 : \*-----1060-----\*-----1080-----\*-----1100-----\*-----1120----- : 1093  
contig\_pNT : TATGAAAATTAAGGAAGAGCTTCCACATTTCTAGGAAGTAACAAACCTGTAAGGACGAATATATGTTAGTTTAAAGTA : 1120  
TATGAAAATTAAGGAAGAGCTTCCACATTTCTAGGAAGTAACAAACCTGTAAGGACGAATATATGTTAGTTTAAAGTA

MRJP2 : \*-----1140-----\*-----1160-----\*-----1180-----\*-----1200----- : 1173  
contig\_pNT : ACAAAAATGCAGAAAATAGTAAATAATGATTTAATTTCAACGACGTAACCTTCCGAATTTGGGTGCGAATGTAAGGAA : 1200  
ACAAAATGCAGAAAATAGTAAATAATGATTTAATTTCAACGACGTAACCTTCCGAATTTGGGTGCGAATGTAAGGAA

MRJP2 : \*-----1220-----\*-----1240-----\*-----1260-----\*-----1280----- : 1253  
contig\_pNT : TTAATGAGAAATACTCATTGCGCAAAATTTAACAATAAAAAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAA : 1280  
TTAATGAGAAATACTCATTGCGCAAAATTTAACAATAAAAAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAA

MRJP2 : \*-----1300-----\*-----1320-----\*-----1340-----\*-----1360----- : 1333  
contig\_pNT : CAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAATACTA : 1360  
CAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAATACTA

MRJP2 : \*-----1380-----\*-----1400-----\*-----1420-----\*-----1440----- : 1347  
contig\_pNT : ACAATTAGAATGAT : 1440  
ACAATTAGAATGAT

ภาพ 24 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *mrjp2* (Accession no. AF525777) ในฐานข้อมูลของ GeneBank กับ Contig ของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pNT2

```

MRJP2_amin : -----* 20 * 40 * 60 * 80 : 74
contig_pNT : MASHHHHHHAIIRQNSAKNLNSLVNVIHEWRYIDYDFGSEERRQAATQSGEYDHTKNYPFQVDQWHDKTFVTILKYDGVPSSTL : 83
AIIRQNSAKNLNSLVNVIHEWRYIDYDFGSEERRQAATQSGEYDHTKNYPFQVDQWHDKTFVTILKYDGVPSSTL

* 100 * 120 * 140 * 160
MRJP2_amin : IINTSNKIGKGGRLQPYPDWMSWAENKDCSGIVSAFKIAIDKFDRLWVLDGSLINRTEPICAPKLVHFDLKNTKHLKQIEIPH : 157
contig_pNT : IINTSNKIGKGGRLQPYPDWMSWAENKDCSGIVSAFKIAIDKFDRLWVLDGSLINRTEPICAPKLVHFDLKNTKHLKQIEIPH : 166
NMTSNKIGKGGRLQPYPDWMSWAENKDCSGIVSAFKIAIDKFDRLWVLDGSLINRTEPICAPKLVHFDLKNTKHLKQIEIPHD

* 180 * 200 * 220 * 240
MRJP2_amin : IAVNATTGKGGVLVSLVQQAMDPMNTLVYIADHKGDALIVYQNSDSSFHRMNTSNTFDYDPRYAKMTINGESFTLKNIGICGMALS : 240
contig_pNT : IAVNATTGKGGVLVSLVQQAMDPMNTLVYIADHKGDALIVYQNSDSSFHRMNTSNTFDYDPRYAKMTINGESFTLKNIGICGMALS : 249
IAVNATTGKGGVLVSLVQQAMDPMNTLVYIADHKGDALIVYQNSDSSFHRMNTSNTFDYDPRYAKMTINGESFTLKNIGICGMALS

* 260 * 280 * 300 * 320 *
MRJP2_amin : PVTNNLYYSPLASHGLYYVNTTEPFMKSQFGDNNNVQYEGSQDTLNTQSLAKAVSKDGVLFVGLVGNHAGLCLNEHQPLQRENH : 323
contig_pNT : PVTNNLYYSPLASHGLYYVNTTEPFMKSQFGDNNNVQYEGSQDTLNTQSLAKAVSKDGVLFVGLVGNHAGLCLNEHQPLQRENH : 332
PVTNNLYYSPLASHGLYYVNTTEPFMKSQFGDNNNVQYEGSQDTLNTQSLAKAVSKDGVLFVGLVGNHAGLCLNEHQPLQRENH

340 * 360 * 380 * 400 *
MRJP2_amin : ELVAQNEKTLQMIAGMKIKKELPHEVGSNKPVKDEYMLVLSNKKQKIVVNDNFNFDVNFRI LGANVKELMRNTHCANFNHNKNN : 406
contig_pNT : ELVAQNEKTLQMIAGMKIKKELPHEVGSNKPVKDEYMLVLSNKKQKIVVNDNFNFDVNFRI LGANVKELMRNTHCANFNHNKNN : 415
ELVAQNEKTLQMIAGMKIKKELPHEVGSNKPVKDEYMLVLSNKKQKIVVNDNFNFDVNFRI LGANVKELMRNTHCANFNHNKNN

420 * 440 *
MRJP2_amin : QKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQK : 448
contig_pNT : QKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQK : 457
QKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQK

```

ภาพ 25 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนซึ่งแปลรหัสมาจากยีน *mrjp2* (Accession no. AF525777) ในฐานข้อมูลของ GeneBank กับ Contig ของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pNT2 ด้วยโปรแกรม ClustalX

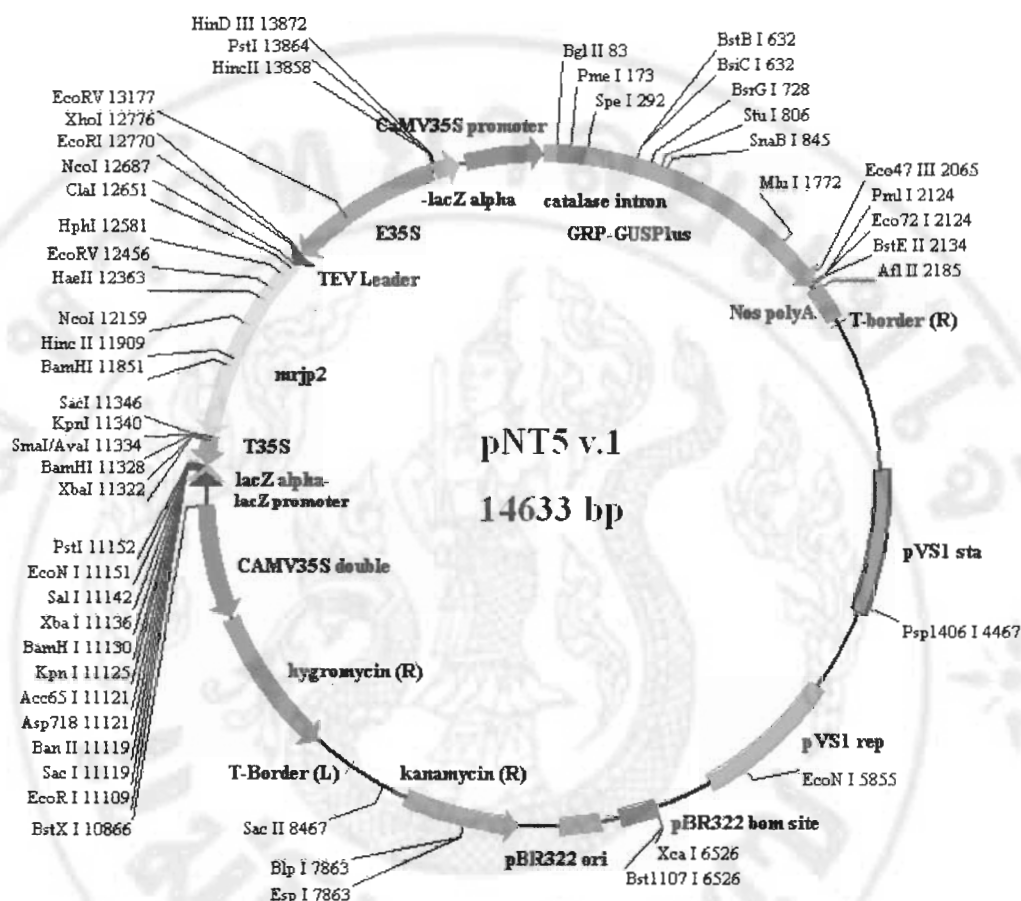
##### 5. การสร้างพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีชุดยีน *mrjp2* สำหรับถ่ายยีนในข้าว

หลังจากได้พลาสมิด pNT2 แล้ว จึงได้ทำการแยกเอาชุดยีน *mrjp2* ซึ่งประกอบด้วย 35S double enhancer promoter (ได้จาก Cauliflower Mosaic Virus) ซึ่งต่อกับ TEV leader sequence ซึ่งมียีน *mrjp2* และ 35S terminator เข้ากับพลาสมิด pBluescript KS II+ ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ได้เป็นพลาสมิด pNT4 เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณชุดยีน เนื่องจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ทำได้ยาก เพราะผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการมีขนาดใหญ่ (ประมาณ 2.7 กิโลเบส) และอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Cloning vector ที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนสูง

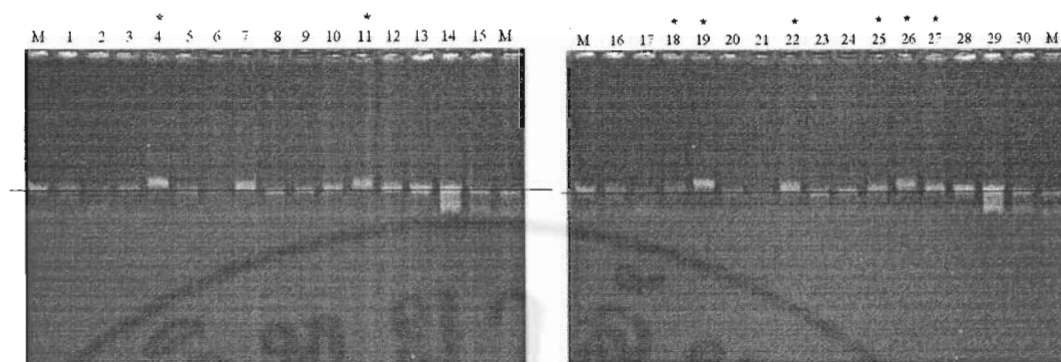
เมื่อทำการสร้างพลาสมิด pNT4 แล้ว จึงทำการเพิ่มปริมาณชุดยีน *mrjp2* โดยการเพิ่มปริมาณพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดแล้วจึงทำการแยกชุดยีน *mrjp2* ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I แล้วทำการดิงหมู่ฟอสเฟตออกจากปลาย 5' (phosphorylation) โดยใช้เอนไซม์ Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP; NEB, USA) เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2 (CAMBIA, Australia)

หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อชุดยีน *mrjp2* เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I เป็นพลาสมิด pNT5 (ภาพ 26) แล้วถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  พบว่า ได้โคลนีเกิดขึ้นทั้งหมด 32 โคลนี จากนั้นทำการคัดเลือกโดยใช้วิธีการคัดเลือก

ตามขนาดของพลาสมิด (Rapid size screening) (ภาพ 27) ซึ่งพบว่ามีโคลนที่ได้รับชุดยีน จำนวน 8 โคลน คือ โคลนที่ 4, 11, 18, 19, 22, 25, 26 และ 27



ภาพ 26 แผนที่พลาสมิด pNT5



หมายเหตุ: M คือ โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.2

1 – 30 คือ โคลนของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 1 – 30

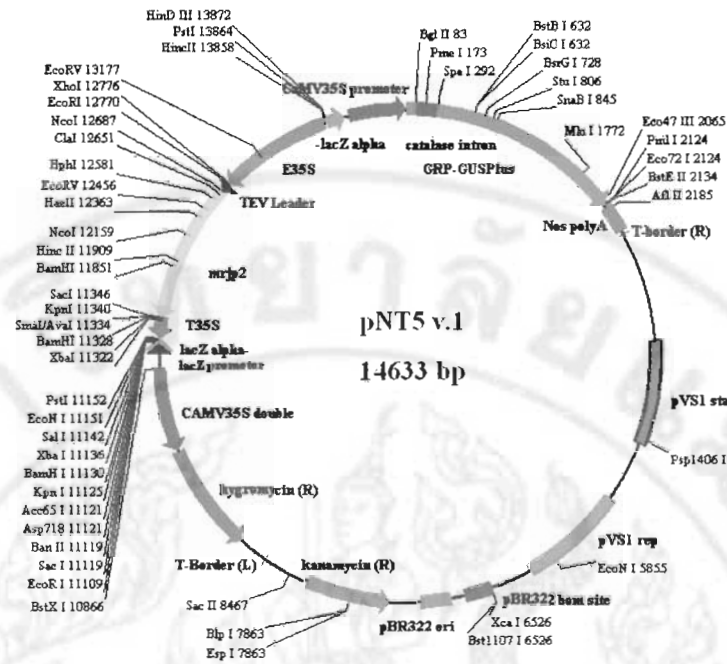
ภาพ 27 การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิด pNT5 ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการเปรียบเทียบขนาดกับพลาสมิดโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2

### 5.1. การคัดเลือกโคลนที่ได้รับชุดยีน

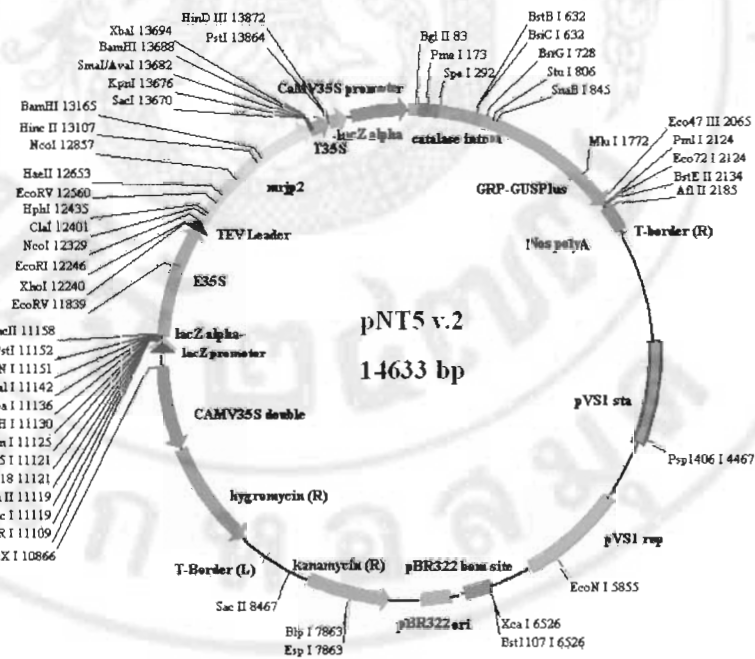
ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับชุดยีนมาสกัดพลาสมิดจากทั้ง 8 โคลนที่ได้ เพื่อใช้ในการตรวจสอบการเข้าแทรกของชุดยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จำนวน 2 ปฏิกริยา ได้แก่

5.1.1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* เพื่อตรวจสอบการได้รับยีน โดยจะได้ชิ้นดีเอ็นเอของชุดยีน *mrjp2* และพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2 ขนาดประมาณ 2,712 และ 11,921 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพ 26)

5.1.2. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* เพื่อตรวจสอบการได้รับยีนและทิศทางการเข้าแทรกของชุดยีน โดยจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 227, 528, 813 และ 1,946 คู่เบส (ชุดยีน *mrjp2*) และ 11,119 คู่เบส (พลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2) ตามลำดับ เมื่อชุดยีนเข้าแทรกแบบที่ 1 แต่ถ้าชุดยีนเข้าแทรกในแบบที่ 2 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 528, 813, 963 และ 1,210 คู่เบส (ชุดยีน *mrjp2*) และ 11,119 คู่เบส (พลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2) ตามลำดับ (ภาพ 28)



ก) แบบที่ 1



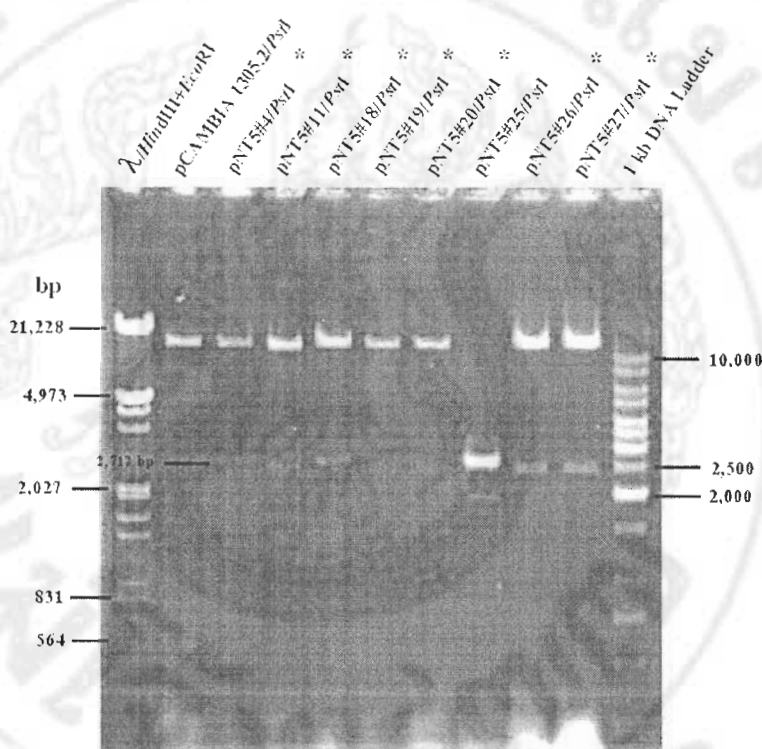
ข) แบบที่ 2

ภาพ 28 แผนที่พลาสมิด pNT5 ทั้ง 2 แบบ

ก) พลาสมิด pNT5 แบบที่ 1 (pNT5 V.1) ชุดยีน *mrjg2* มีทิศทางการรวมเข้มนานาฬิกา

ข) พลาสมิด pNT5 แบบที่ 2 (pNT5 V.2) ชุดยีน *mrjg2* มีทิศทางการตามเข้มนานาฬิกา

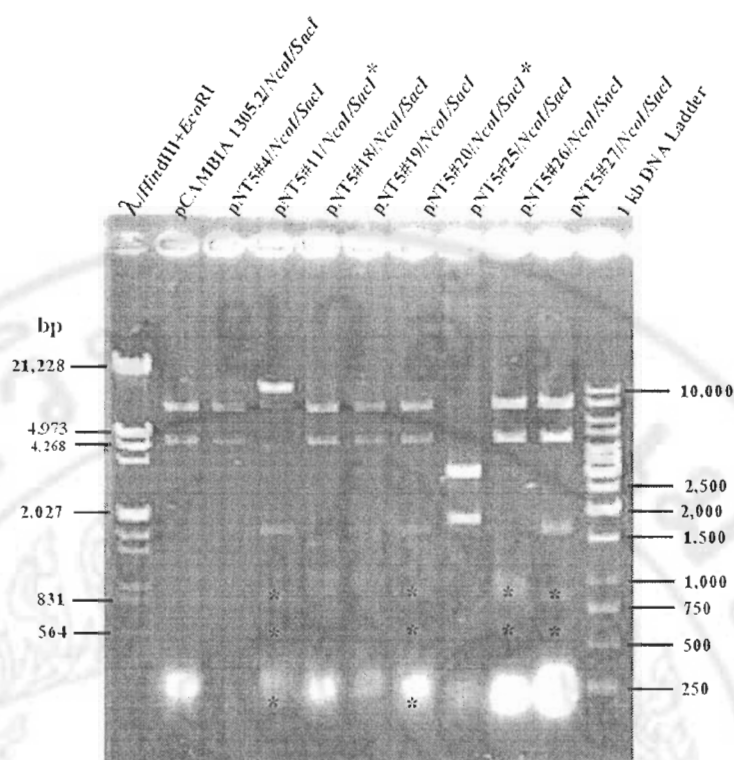
จากการตรวจสอบพลาสมิด pNT5 จากจำนวน 8 โคลน ที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิค Rapid size screening โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I พบว่า พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 4, 11, 18, 19, 20, 26, และ 27 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2,712 คู่เบส ดังที่คาดไว้ ส่วนโคลนที่ 25 ไม่ได้ดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ (ภาพ 29) จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องและทิศทางในการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอด้วยการตัดพลาสมิด pNT5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I พบว่ามีพลาสมิดจำนวน 2 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 11 และ 20 ได้ชิ้นดีเอ็นเอตรงกับพลาสมิด pNT5 แบบที่ 1 ในขณะที่โคลนอื่น ๆ ไม่ได้ดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ในแบบที่ 1 หรือ 2 (ภาพ 30)



หมายเหตุ:  $\lambda$ HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI  
 pCambia 1305.2/*Pst*I คือ พลาสมิด pCambia 1305.2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I  
 pNT5#4 – 27/*Pst*I คือ พลาสมิด pNT5 ที่ได้จากโคลนที่ 4 – 27 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I  
 1 kb DNA Ladder คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ภาพ 29 การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 ที่สกัดได้จากทั้ง 8 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCambia 1305.2





หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI  
 pCAMBIA 1305.2/NcoI/SacI คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI  
 pNT5#4 - 27/ NcoI/SacI คือ พลาสมิด pNT5 ที่ได้จากโคลนที่ 4 - 27 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI  
 1 kb DNA Ladder คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ภาพ 30 การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 ที่สกัดได้จากทั้ง 8 โคลน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.2

## 5.2. การตรวจสอบทิศทางการเข้าแทรกของชุดยีนในพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2

จากการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ปฏิกริยา จึงเลือกพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 และ 20 ซึ่งคาดว่าเป็นพลาสมิด pNT5 แบบที่ 1 มาทำการยืนยันผลโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ปฏิกริยา ได้แก่

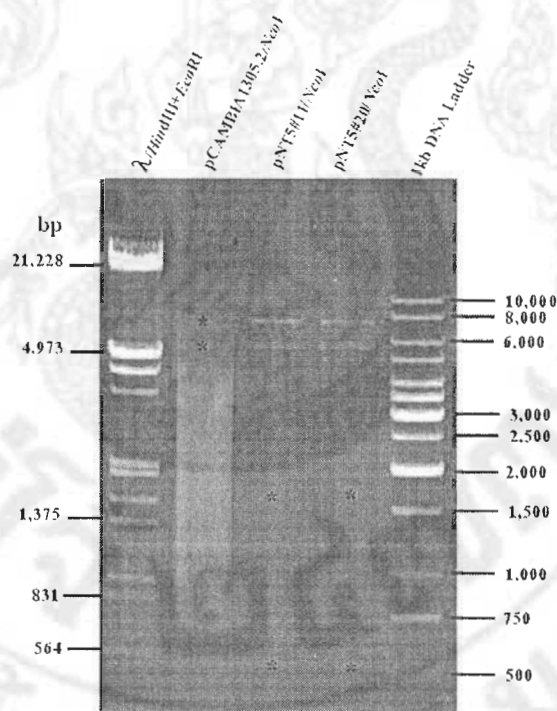
5.2.1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 2,712 และ 11,921 คู่เบส

5.2.2. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 227, 528, 813, 1,946 และ 11,119 คู่เบส

5.2.3. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *PstI* คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 528, 769, 1007, 1,177 และ 11,152 คู่เบส

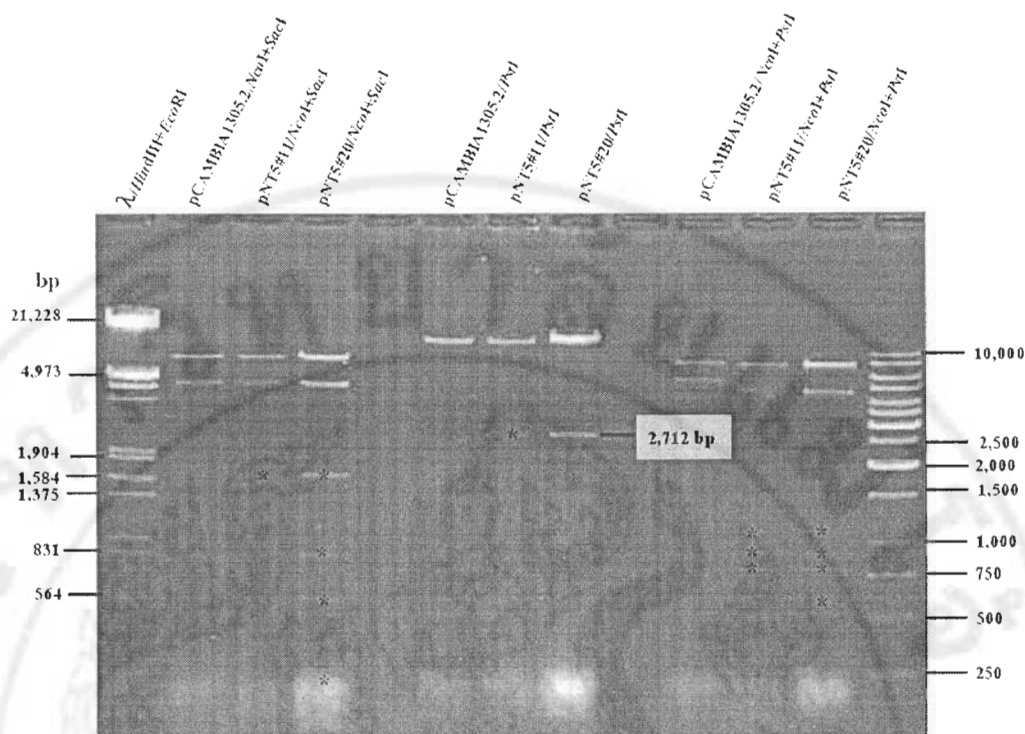
5.2.4. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* คาดว่าจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 528, 1,946 และ 12,159 คู่เบส

จากการตรวจสอบพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 และ 20 พบว่า เมื่อตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ปฏิกริยา พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 20 ได้ชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดที่คาดหวังไว้ครบทั้ง 4 ปฏิกริยา ในขณะที่พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 227, 528 และ 813 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* และไม่พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 528 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *PstI* ดังที่คาดไว้ (ภาพ 31 และ 32)



หมายเหตุ:  $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRI*  
 pCambia 1305.2/*NcoI* คือ พลาสมิด pCambia 1305.2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI*  
 pNT5#11/*NcoI* คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI*  
 pNT5#20/*NcoI* คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 20 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI*  
 1 kb DNA Ladder คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ภาพ 31 การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 และ 20 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCambia 1305.2



หมายเหตุ:

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| $\lambda$ HindIII + EcoRI | คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน $\lambda$ ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI        |
| pCAMBIA 1305.2/NcoI/SacI  | คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI  |
| pNT5#11/ NcoI/SacI        | คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI |
| pNT5#20/ NcoI/SacI        | คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 20 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ SacI |
| pCAMBIA 1305.2/NcoI       | คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI           |
| pNT5#11/ NcoI             | คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI          |
| pNT5#20/ NcoI             | คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 20 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI          |
| pCAMBIA 1305.2/NcoI/PstI  | คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ PstI  |
| pNT5#11/ NcoI/PstI        | คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ PstI |
| pNT5#20/ NcoI/PstI        | คือ พลาสมิด pNT5 โคลนที่ 20 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ PstI |
| 1 kb DNA Ladder           | คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder                                   |

ภาพ 32 การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 โคลนที่ 11 และ 20 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI กับ SacI, NcoI และ NcoI กับ PstI เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAMBIA 1305.2

6. การถ่ายฝากพลาสมิด pNT5 เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย เพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนในข้าว เมื่อทำการสร้างพลาสมิด pNT5 โดยการแทรกชุดยีน *mrjp2* เข้าที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ของพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2 ซึ่งบริเวณ T – DNA ประกอบด้วยยีน 3 ชนิด ได้แก่

#### 6.1. ยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*)

เมื่อมีการแสดงออกจะผลิตโปรตีนนมผึ้ง (MRJP2) โดยการควบคุมของ 35S dual enhancer promoter ต่อกับ TEV leader sequence เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนในระดับสูงตลอดเวลาในทุกเนื้อเยื่อพืช

#### 6.2. ยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (hygromycin phosphotransferase: *hptII*)

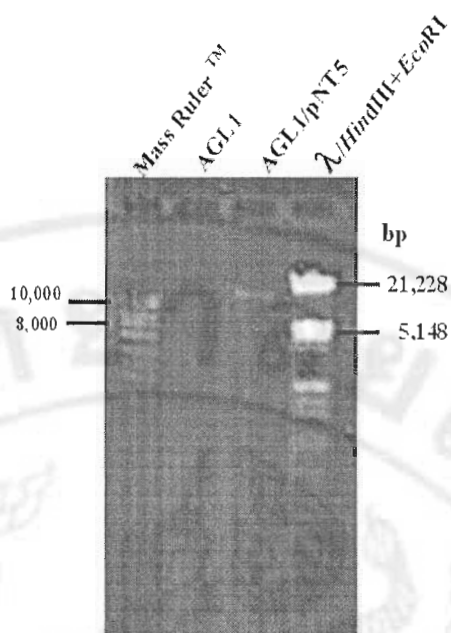
ใช้เป็นยีนคัดเลือก (selectable marker gene) เมื่อมีการแสดงออกจะผลิตเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase โดยการควบคุมของ 35S promoter เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนในทุกเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชที่ได้รับยีนสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

#### 6.3. ยีนสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase (*gusA*)

ใช้เป็นยีนรายงานผล (reporter gene) เมื่อมีการแสดงออกจะผลิตเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase โดยการควบคุมของ 35S promoter เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนในทุกเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชที่ได้รับยีนสามารถเปลี่ยนสาร X - gluc (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl glucuronide) เป็นสารที่มีสีฟ้าได้

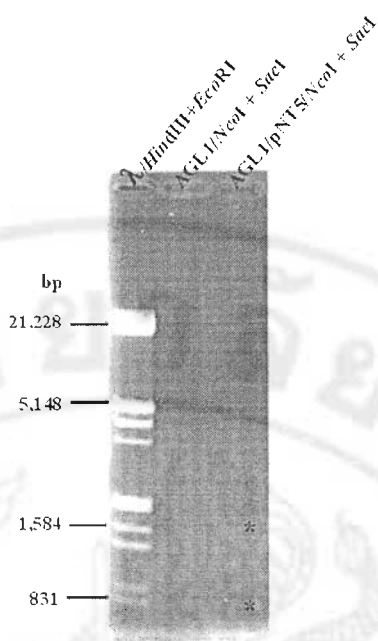
หลังจากทำการถ่ายฝากพลาสมิดเวกเตอร์ pNT5 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ AGL1 และเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ได้โคโลนีเกิดขึ้นทั้งหมด 1 โคโลนี จากนั้นเปรียบเทียบกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ไม่ได้ถ่ายฝากพลาสมิด (ภาพ 33) โดยการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SacI* เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด พบว่า เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ได้รับพลาสมิด pNT5 มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ตรงกับพลาสมิด pNT5 ที่สกัดได้จากเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (ภาพ 34)

ดังนั้นสามารถใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pNT5 ในการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ต่อไป



หมายเหตุ: Mass Ruler™ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน MassRuler™ DNA Ladder, High Range  
 AGL1 คือ พลาสมิดที่ได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1  
 AGL1/pNT5 คือ พลาสมิดที่ได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ถ่าย  
 ฝากพลาสมิด pNT5  
 $\lambda$ /HindIII + EcoRI คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$  ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ EcoRI

ภาพ 33 พลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ไม่ได้ถ่ายฝากพลาสมิด  
 และได้รับพลาสมิด pNT5



หมายเหตุ:	Mass Ruler™	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน MassRuler™ DNA Ladder, High Range
	AGL1/ <i>Nco</i> I + <i>Sac</i> I	คือ พลาสมิดที่ได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I และ <i>Sac</i> I
	AGL1/pNT5/ <i>Nco</i> I + <i>Sac</i> I	คือ พลาสมิดที่ได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ถ่ายฝากพลาสมิด pNT5 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I และ <i>Sac</i> I
	λ/ <i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III และ <i>Eco</i> RI

**ภาพ 34** การตรวจสอบพลาสมิด pNT5 ในเซลล์อะโกรแบคทีเรีย โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับพลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่ไม่ได้ถ่ายฝากพลาสมิด

### การเพาะเลี้ยงแคลลัสและการชักนำให้เกิดขึ้น

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยการนำเมล็ดแก่มาลอกเปลือกออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร N6 ดัดแปลงซึ่งเติมฮอร์โมน 2, 4 - D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (พิชญภา, 2547) พบว่า มีการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบเลี้ยง (scutellum) บริเวณรอบอเอ็มบริโอ ร้อย

ละ 80.82 โดยแคลลัสมีลักษณะกลมแน่น สีเหลืองอ่อน (ภาพ 35ก) ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสชนิดเอมบริโอเจนิคที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นสูง และกลุ่มแคลลัส มีขนาด 11.1 มิลลิเมตร (ตาราง 1)

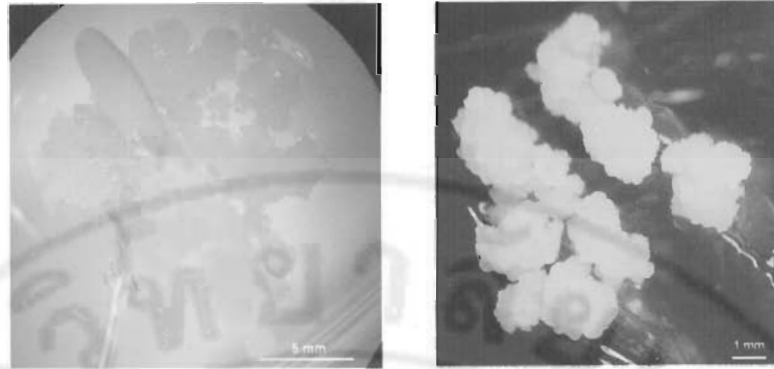
ส่วนข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake เมื่อนำเมล็ดแก่มาฟอกฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร N6 คัดแปลงซึ่งเติมฮอร์โมน 2, 4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบเลี้ยง (scutellum) บริเวณรอบเอมบริโอ ร้อยละ 84.29 โดยแคลลัสมีลักษณะกลมแน่น สีเหลืองอ่อน (ภาพ 35ข) ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสชนิดเอมบริโอเจนิคที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นสูง และกลุ่มแคลลัสมีขนาด 10.7 มิลลิเมตร (ตาราง 1)

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีสภาวะในการเกิดแคลลัสแตกต่างจากข้าวไทยหลาย ๆ ชนิด เช่น อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ระยะเวลาในการเกิดแคลลัส ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน เป็นต้น โดยข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งมี 2, 4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะมีด เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ (จันทร์ประภา, 2543) ในขณะที่ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ใช้เวลาเพียง 4 สัปดาห์ (กิตติกร, 2546; พิชญภา, 2547)

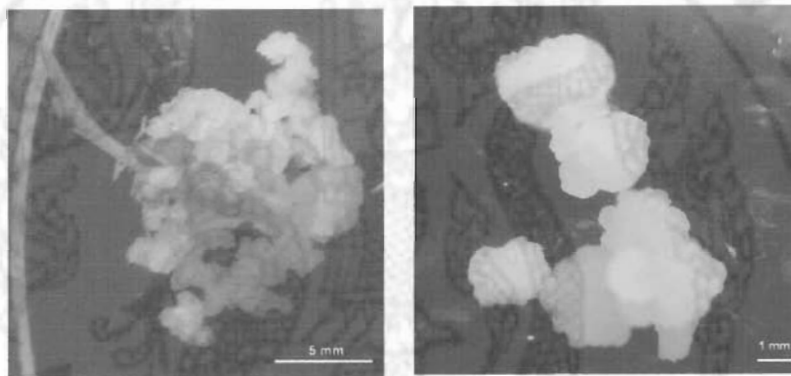
ในส่วนของระดับฮอร์โมน พบว่า ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เกิดแคลลัสเมื่อให้ระดับฮอร์โมน 2, 4 - D ที่สูง คล้ายกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 หอมสุพรรณบุรี (สุพรรณฎีกา, 2548) ในขณะที่ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ถูกชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้ 2, 4 - D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์เจ้าฮ่อ และ R258 ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร N6 ในขณะที่ข้าวไร่พันธุ์น้ำรู่ และดอกพะยอมเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้น 2, 4 - D เท่ากัน (น้ำทิพย์, 2544)

ตาราง 1 ร้อยละของการเกิดแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N6 คัดแปลงซึ่งมีการเติมฮอร์โมน 2, 4 - D

พันธุ์ข้าว	Subspecies	2, 4 - D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สภาวะในการชักนำ ให้เกิดแคลลัส	ร้อยละของ การเกิดแคลลัส	ขนาดของ แคลลัส (มิลลิเมตร)
กข 6	<i>Indica</i>	4.0	แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน	80.82	11.1
Kitaake	<i>Japonica</i>	2.0	ที่มีด	84.29	10.7



ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

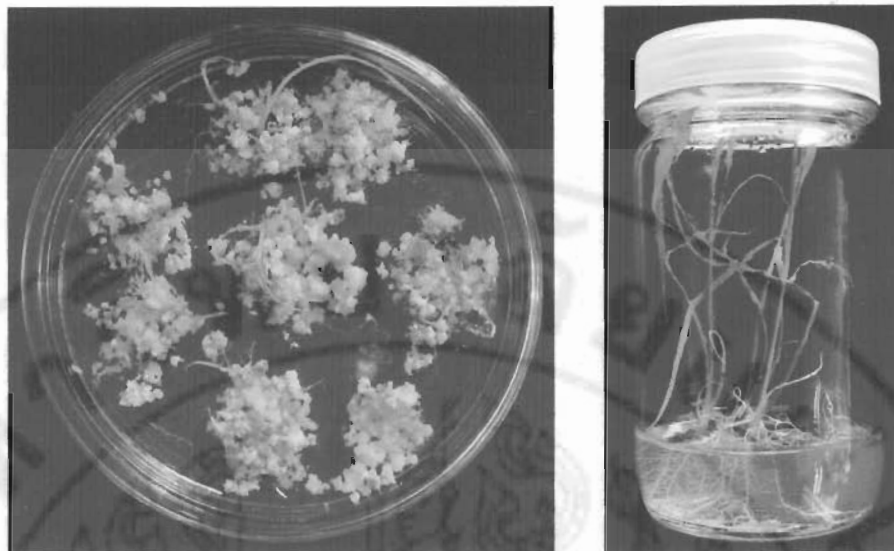


ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

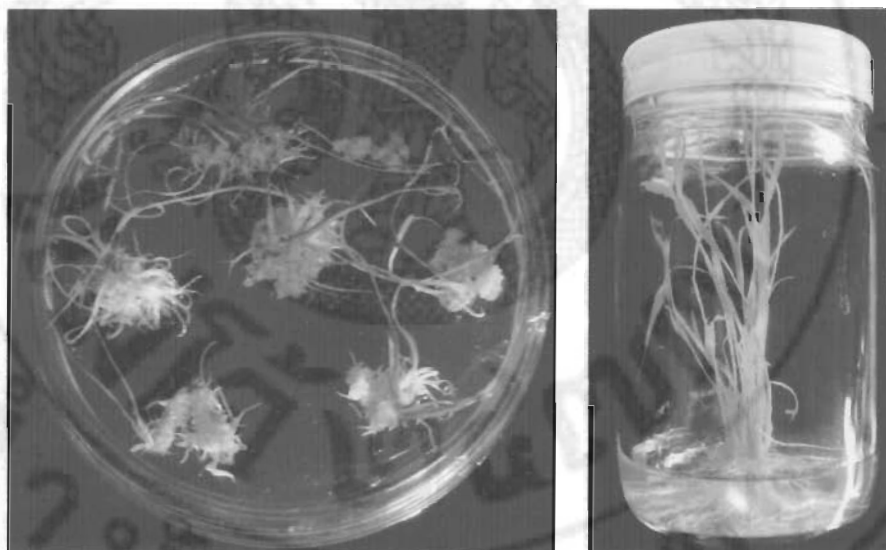
ภาพ 35 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N6 ซึ่งเติมฮอร์โมน 2, 4 - D เข้มข้น 4 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ส่วนการชักนำให้เกิดขึ้นนำแคลลัสทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS คัดแปลง ซึ่งเติมฮอร์โมน NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีต้นอ่อนเกิดขึ้น จึงย้ายไปกระตุ้นให้ออกรากในขวดซึ่งมีอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน พบว่า แคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถกระตุ้นและราก และเจริญเติบโตได้มากกว่า ร้อยละ 80 (ภาพ 36)





ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

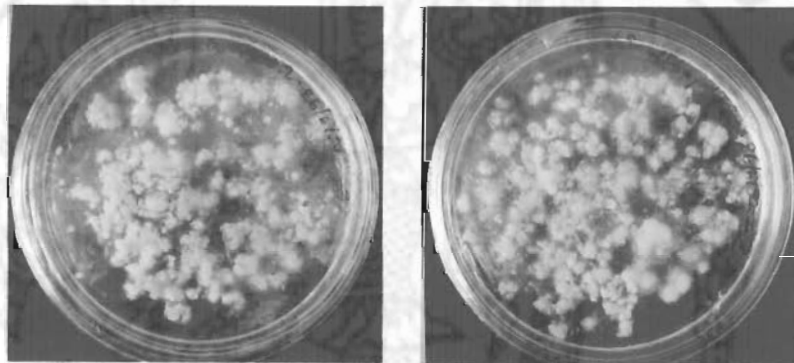


ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

ภาพ 36 ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ซึ่งเติมฮอร์โมน NAA และ Kinetin เข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

## การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าว

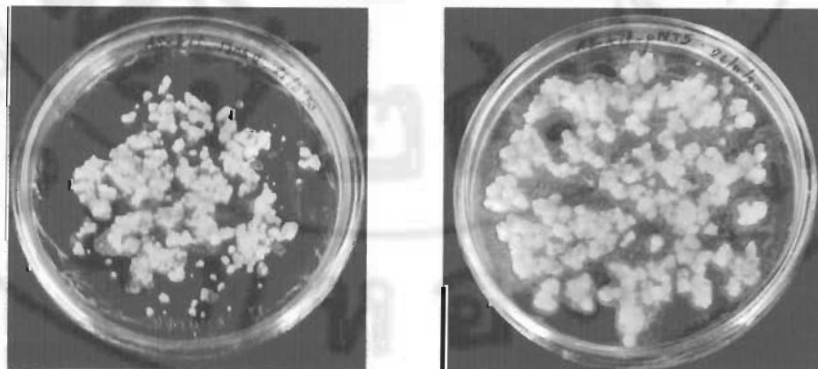
เมื่อชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์แล้ว ทำการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrfp2*) ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Toki (1997) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ซึ่งมีพลาสมิด pNT5 โดยให้มีปริมาณสารละลายอะซิโตไซริงโกนเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างแคลลัสและเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เป็นเวลานาน 3 วัน เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีการเจริญเป็นชั้นบาง ๆ รอบแคลลัส ในขณะที่แคลลัสยังคงมีการแบ่งตัวเล็กน้อย และมีลักษณะเป็นก้อนกลม สีเหลือง (ภาพ 37)



pCAMBIA 1305.2

pNT5

ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6



pCAMBIA 1305.2

pNT5

ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

หมายเหตุ: pCAMBIA 1305.2

คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2

pNT5

คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

ภาพ 37 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เป็นเวลา 3 วัน

หลังจากทำการล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งมียาปฏิชีวนะไทเมนทินเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้ว ทำการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับขึ้นโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ร้อยละ 55.40 และ 54.58 ตามลำดับ ในขณะที่ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ร้อยละ 75.89 และ 84.51 ตามลำดับ (ตาราง 2; ภาพ 38)

เมื่อทำการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับขึ้น ครั้งที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 วัน พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ร้อยละ 73.32 และ 65.48 ตามลำดับ ในขณะที่ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ร้อยละ 68.04 และ 83.02 ตามลำดับ (ตาราง 3; ภาพ 39)

ตาราง 2 ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน หลังการคัดเลือกครั้งที่ 1

สายพันธุ์	Subspecies	พลาสมิด	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก <sup>1</sup>
กข 6	<i>Indica</i>	pCAMBIA 1305.2	600	55.40 <sup>b</sup>
กข 6	<i>Indica</i>	pNT5	570	54.58 <sup>b</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pCAMBIA 1305.2	630	75.89 <sup>a</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pNT5	600	84.51 <sup>a</sup>

หมายเหตุ:

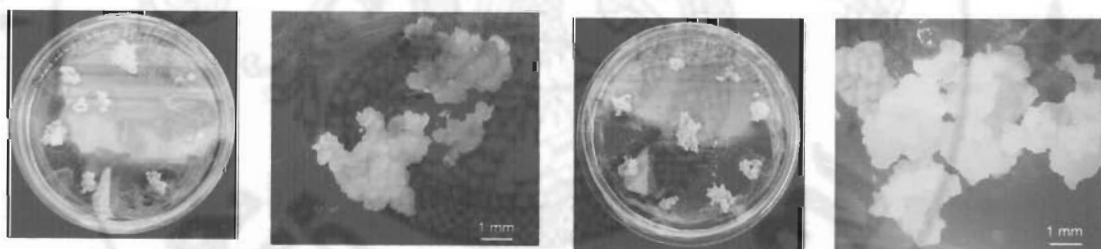
- <sup>1</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)
- แคลลัสเริ่มต้นเป็นแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ตาราง 3 ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน หลังการคัดเลือกครั้งที่ 2

สายพันธุ์	Subspecies	พลาสมิด	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก <sup>1</sup>
กข 6	<i>Indica</i>	pCAMBIA 1305.2	460	73.32 <sup>ab</sup>
กข 6	<i>Indica</i>	pNT5	440	65.48 <sup>b</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pCAMBIA 1305.2	380	68.04 <sup>b</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pNT5	420	83.02 <sup>a</sup>

หมายเหตุ:

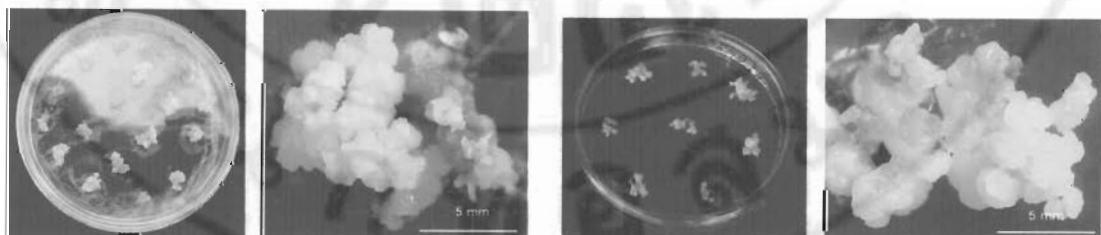
- <sup>1</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)
- แคลลัสเริ่มต้นเป็นแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1



pCAMBIA 1305.2

pNT5

ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6



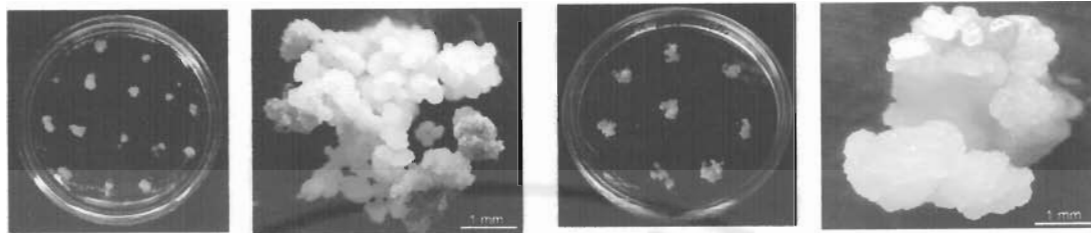
pCAMBIA 1305.2

pNT5

ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

หมายเหตุ: pCAMBIA 1305.2 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2  
pNT5 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

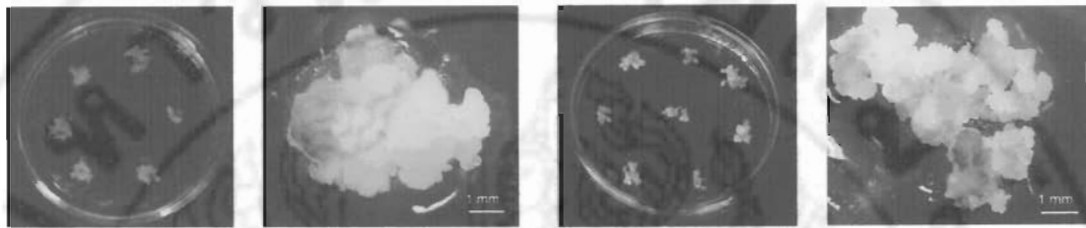
ภาพ 38 ดัชนีของแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน



pCAMBIA 1305.2

pNT5

## ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6



pCAMBIA 1305.2

pNT5

## ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

หมายเหตุ: pCAMBIA 1305.2 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2  
pNT5 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

ภาพ 39 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ครั้งที่ 2 ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

หลังจากการคัดเลือกแคลลัสบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินแล้ว แคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกถูกนำมาชักนำให้เกิดต้น โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ครั้งที่ 1 เป็นเวลา 14 วัน พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ร้อยละ 91.30 และ 91.25 ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake เจริญได้ ร้อยละ 100.00 และ 81.48 ตามลำดับ โดยแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 6 และ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 เกิดจุดสีเขียว ร้อยละ 37.68 และ 9.88 ตามลำดับ และสามารถเกิดยอดอ่อนได้ทั้งหมด 0 และ 63 ยอดตามลำดับ และแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ไม่เกิดยอดอ่อนเลย (ตาราง 4; ภาพ 40)

เมื่อทำการชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นเวลา 14 วัน พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ร้อยละ 91.38 และ 96.51

ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake เจริญได้ ร้อยละ 100.00 และ 92.25 ตามลำดับ โดยแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 6 และ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 เกิดจุดสีเขียว ร้อยละ 68.97, 6.19 และ 9.30 ตามลำดับ โดยข้าวพันธุ์ Kitaake สามารถเกิดยอดอ่อนได้ 94 และ 26 เมื่อถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิดทั้งสองชนิดไม่เกิดต้น (ตาราง 5; ภาพ 41)

จากการศึกษาการถ่ายยีน เมื่อทำการชักนำให้เกิดต้นด้วยอาหารสูตร MS ซึ่งมีฮอร์โมน NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไโคเนติน เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake สามารถเกิดต้นจากแคลลัสได้ แต่ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 พบเพียงแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเท่านั้น คาดว่าน่าจะเกิดจากการเข้าแทรกของยีนในจีโนมแบบสุ่ม หรือระบบในการชักนำให้เกิดต้นหลังการถ่ายยีนไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นต้นได้ ในขณะที่ Pipatpanukul et al. (2004) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 แต่จากการทดลองของถัดดาวัลย์ (2548) ไม่สามารถใช้ระบบเดียวกันในการถ่ายยีนในเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ กข 6 ได้ และไม่พบรายงานการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 อื่นเลย คาดว่า การชักนำให้เกิดต้นของข้าวพันธุ์ กข 6 หลังการถ่ายยีนยังไม่คงที่ อาจเกิดจากระดับฮอร์โมน 2, 4 - D ที่สูงในการเพาะเลี้ยงแคลลัส ทำให้เกิดการสะสมของฮอร์โมน และไม่เกิดการพัฒนาเป็นต้น โดยจะเห็นได้ว่า ข้าวพันธุ์ Kitaake ใช้ระดับฮอร์โมน 2, 4 - D ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสเท่ากับข้าวไทยหลายพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ประภา และ พรทิพย์, 2537; จันทรประภา, 2543) ข้าวพันธุ์เจ้าหอ ข้าวไร่พันธุ์น้ำรุ ดอกพะยอม และ R258 (น้ำทิพย์, 2544) กข 15 (ขวัญเดือน, 2544) ซึ่งประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนและชักนำให้เกิดต้นหลังการถ่ายยีน

ตาราง 4 ผลการพัฒนาเป็นต้นของแคตลัสที่เจริญได้บนอาหารที่มีอายุที่เจริญแล้ว ๖ ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารชงนำไปให้คิดน ครั้งที่ 1

สายพันธุ์	Subspecies	พลาสมิด	จำนวนแคตลัสทั้งหมด	ร้อยละของแคตลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก <sup>1</sup>	ร้อยละของแคตลัสที่เกิดจุดเขียว <sup>1</sup>	ร้อยละของแคตลัสที่เกิดราก <sup>1</sup>	จำนวนยอดอ่อนทั้งหมด
กข 6	<i>Indica</i>	pCAMBIA 1305.2	138	91.30 <sup>ab</sup>	37.68 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
กข 6	<i>Indica</i>	pNT5	112	81.25 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pCAMBIA 1305.2	81	100.00 <sup>a</sup>	9.88 <sup>b</sup>	27.16 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pNT5	108	81.48 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	2.78 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

หมายเหตุ:

1. หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)
2. แคตลัสเริ่มต้นเป็นแคตลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2

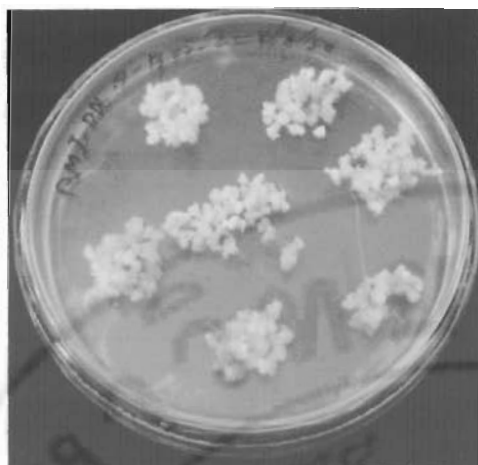
ตาราง 5 ผลการพัฒนามาเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญ ได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 2

สายพันธุ์	Subspecies	พลาสมิด	จำนวนแคลลัสทั้งหมด	ร้อยละของแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก <sup>1</sup>	ร้อยละของแคลลัสที่เกิดจุดเขียว <sup>1</sup>	ร้อยละของแคลลัสที่เกิดราก <sup>1</sup>	จำนวนยอดอ่อนทั้งหมด
กข 6	<i>Indica</i>	pCAMBIA 1305.2	58	91.38 <sup>a</sup>	68.97 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
กข 6	<i>Indica</i>	pNT5	86	96.51 <sup>a</sup>	17.44 <sup>b</sup>	34.88 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pCAMBIA 1305.2	113	100.00 <sup>a</sup>	6.19 <sup>b</sup>	23.01 <sup>ab</sup>	94 <sup>a</sup>
Kitaake	<i>Japonica</i>	pNT5	129	92.25 <sup>a</sup>	9.30 <sup>b</sup>	42.64 <sup>a</sup>	26 <sup>b</sup>

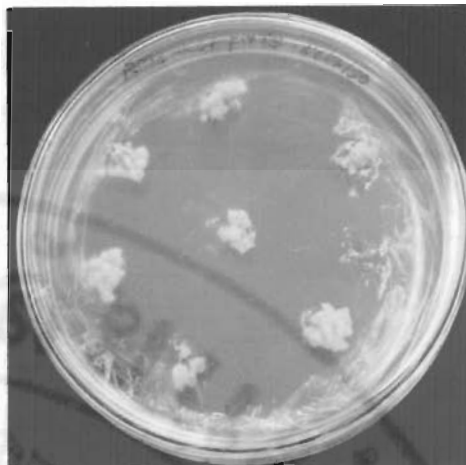
หมายเหตุ:

1. หมายถึง ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)
2. แคลลัสเริ่มต้นเป็นแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 1



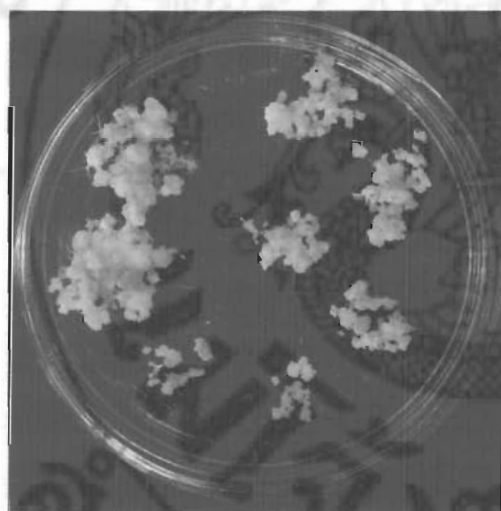


pCAMBIA 1305.2

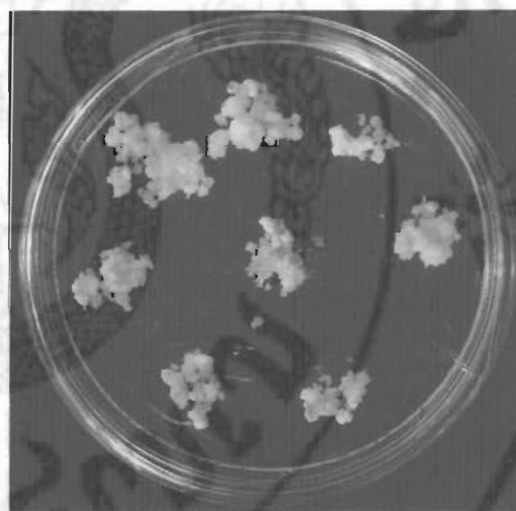


pNT5

ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6



pCAMBIA 1305.2



pNT5

ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

หมายเหตุ:

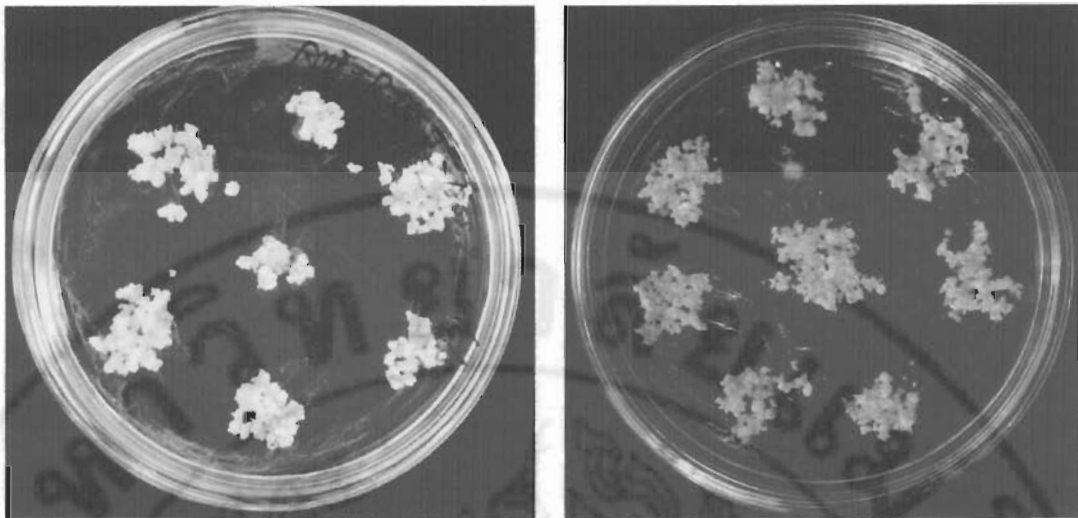
pCAMBIA 1305.2

คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2

pNT5

คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

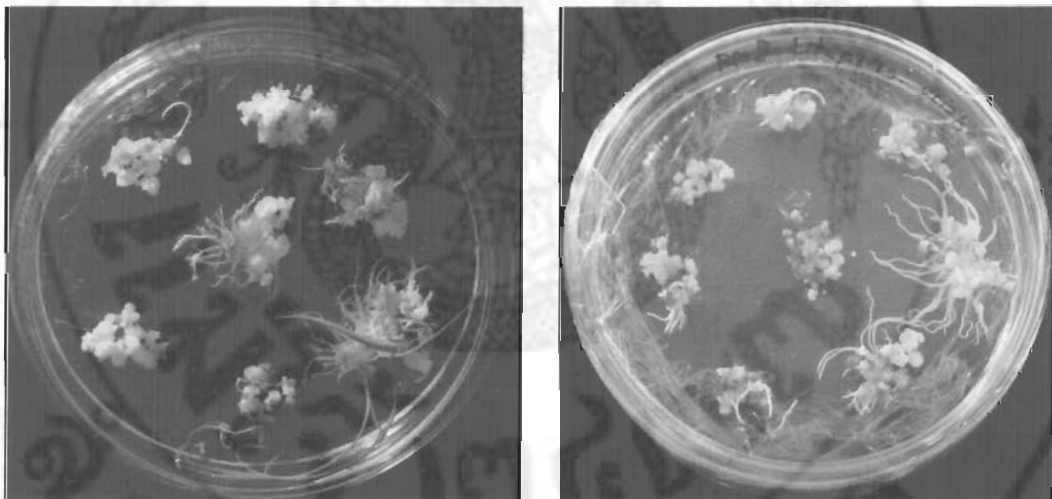
ภาพ 40 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 1 ซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกราบิซิน



pCAMBIA 1305.2

pNT5

ก) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6



pCAMBIA 1305.2

pNT5

ข) ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

หมายเหตุ: pCAMBIA 1305.2 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2  
pNT5 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

ภาพ 41 ลักษณะแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (ก) และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (ข) ที่เจริญได้บนอาหารชักนำให้เกิดต้น ครั้งที่ 2 ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ไบโกลินซิน

เมื่อย้ายต้นข้าวที่เกิดจากการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสไปกระตุ้นให้ออกรากในอาหาร  
 แข็งสูตร ½ MS พบว่า ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญได้และ  
 มีการเกิดรากเป็นปกติ (ภาพ 42) จากนั้นจึงนำออกปลูกลงดิน (ภาพ 43) และปลูกลงกระถางใน  
 โรงเรือน (ภาพ 44) โดยได้ต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2  
 (Kitaake – 1305.2) และพลาสมิด pNT5 (Kitaake – pNT5) จำนวน 7 และ 30 ต้น ตามลำดับ (ภาพ 45  
 และ 46) ซึ่งต้องทำการตรวจสอบการได้รับยีนด้วยเทคนิค GUS assay ต่อไป



pCAMBIA 1305.2



pNT5

หมายเหตุ: pCAMBIA 1305.2 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2  
 pNT5 คือ แคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

ภาพ 42 ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรม หลังถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA  
 1305.2 (ก) และ pNT5 (ข) ที่กระตุ้นให้เกิดรากในอาหารซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกลมัยซิน



ภาพ 43 ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมที่นำออกปลูกลงในดินหลังการกระตุ้นให้  
เกิดรากในอาหารซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

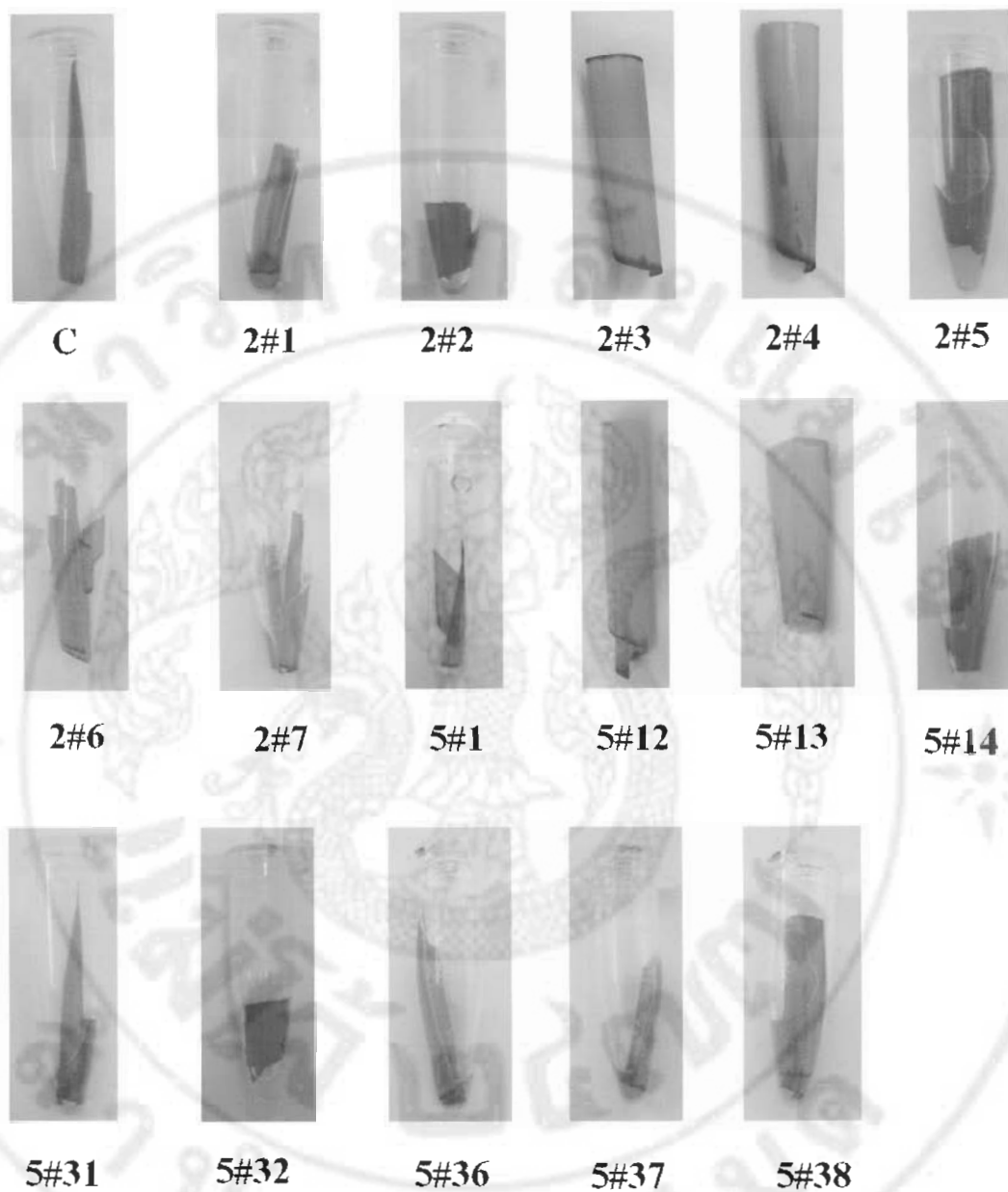


ภาพ 44 ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกลงในโรงเรือน

## การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ $\beta$ -glucuronidase

เมื่อนำต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมซึ่งได้รับการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งด้วยพลาสมิด pNT5 ที่สามารถเจริญได้ในอาหารกระตุ้นให้ออกรากซึ่งมียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 14 วัน ปลูกลงดิน และเจริญเติบโตในโรงเรือนเป็นเวลา 1 เดือนแล้ว จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase หรือ *gusA* โดยใช้เทคนิค GUS assay ด้วยการบ่มชิ้นส่วนใบร่วมกับสารละลาย X-Gluc พบว่า ใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ปกติ ไม่เกิดสารสีฟ้า ในขณะที่ใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ทั้ง 7 ต้น และใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งจำนวน 9 ต้น จากทั้งหมด 38 ต้น (ร้อยละ 12.22) ได้แก่ ต้นที่ 1, 12, 13, 14, 31, 32, 36, 37 และ 38 เกิดสารสีฟ้า (ตาราง 6; ภาพ 45)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase หรือ *GUSPlus* โดยใช้เทคนิค GUS assay จะเห็นได้ว่าใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมเกิดสารสีฟ้าบริเวณรอยตัด ขกเว้นใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1, 2 และ 5 รวมทั้งใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 36, 37 และ 38 สังเกตเห็นว่า บริเวณรอยตัดมีสีฟ้าเข้มมาก และทำให้สารละลาย X-Gluc เปลี่ยนเป็นสีฟ้าด้วย คาดว่า ยีน *GUSPlus* มีระดับการแสดงออกของยีนสูง อีกทั้งยีน *GUSPlus* ซึ่งอยู่บนพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 นั้น มีบริเวณของ glycine-rich protein signal ซึ่งเป็น signal peptide ที่จะทำการเคลื่อนย้ายเอนไซม์นี้ไปยังช่องว่างของเซลล์ (apoplastic space) (cambia, 2005) อาจจะเป็นสาเหตุให้สารละลายมีสีฟ้า สอดคล้องกับรายงานการตรวจสอบเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ซึ่งสร้างจากยีน *GUSPlus* ในข้าวและพืชอื่นอีกหลายชนิดซึ่งถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 เช่น ข้าวพันธุ์ Ishikari-shiroge (Liu et al., 2007) *Triphysaria versicolor* (Tomilov et al., 2007) หญ้า Tall fescue (Wang and Ge, 2005) เก๋ากี่ (Du et al., 2005) เป็นต้น



หมายเหตุ: C คือ ใบข้าว Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 2#1 – 2#5 คือ ใบข้าว Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 – 5  
 5#1 – 5#38 คือ ใบข้าว Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 – 38

ภาพ 45 การแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค GUS assay  
 ในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1305.2 และ pNT5

ตาราง 6 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมด้วย  
เทคนิค GUS assay

ต้นข้าว	การสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase
Kitaake#1	-
Kitaake#2	-
Kitaake#3	-
Kitaake - 1305.2#1	+++
Kitaake - 1305.2#2	+++
Kitaake - 1305.2#3	+
Kitaake - 1305.2#4	+
Kitaake - 1305.2#5	+
Kitaake - 1305.2#6	+
Kitaake - 1305.2#7	+
Kitaake - pNT5#1	+
Kitaake - pNT5#3	-
Kitaake - pNT5#4	-
Kitaake - pNT5#12	+
Kitaake - pNT5#13	+
Kitaake - pNT5#14	+
Kitaake - pNT5#15	-
Kitaake - pNT5#16	-
Kitaake - pNT5#17	-
Kitaake - pNT5#18	-
Kitaake - pNT5#19	-
Kitaake - pNT5#20	-
Kitaake - pNT5#21	-
Kitaake - pNT5#22	-
Kitaake - pNT5#23	-

ตาราง 6 (ต่อ)

ต้นข้าว	การสร้างเอนไซม์ $\beta$ - glucuronidase
Kitaake - pNT5#24	-
Kitaake - pNT5#25	-
Kitaake - pNT5#26	-
Kitaake - pNT5#27	-
Kitaake - pNT5#28	-
Kitaake - pNT5#29	+
Kitaake - pNT5#30	+
Kitaake - pNT5#31	+
Kitaake - pNT5#32	+
Kitaake - pNT5#33	-
Kitaake - pNT5#34	-
Kitaake - pNT5#35	-
Kitaake - pNT5#36	++
Kitaake - pNT5#37	++
Kitaake - pNT5#38	++

หมายเหตุ: - คือ ไม่มีการสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase  
 + คือ มีการสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase โดยมีสีฟ้าเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด  
 ++ คือ มีการสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase โดยมีสีฟ้าเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด  
 และสารละลายมีสีฟ้า  
 +++ คือ มีการสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase โดยมีสีฟ้าเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด  
 และสารละลายมีสีฟ้าเข้ม



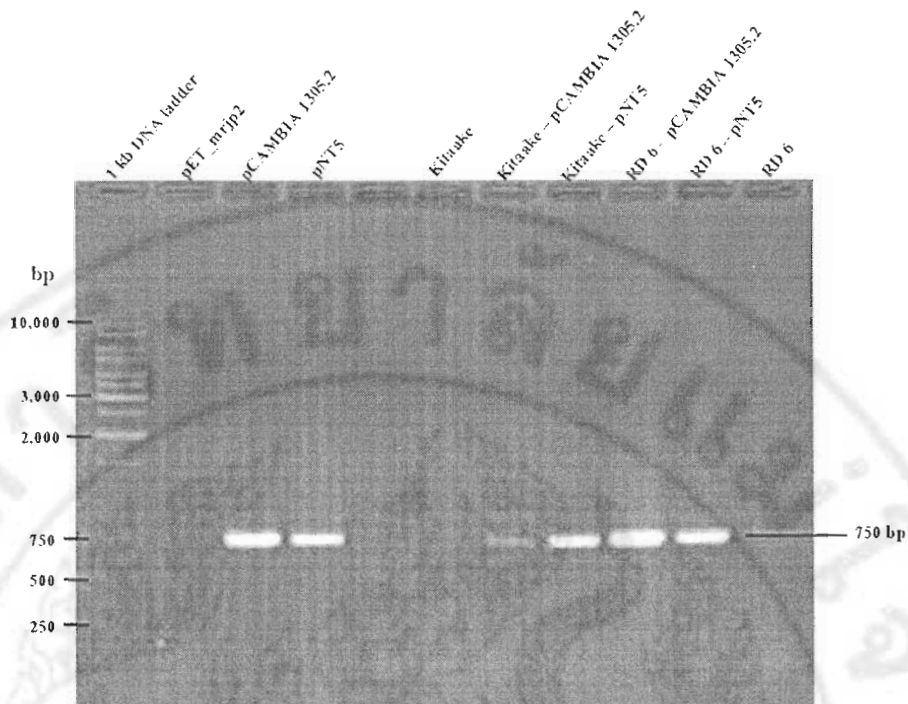
## การวิเคราะห์ยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าวตัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิคชีวโมเลกุล

### 1. การตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าวตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

#### 1.1. การตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งในแคลลัสข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

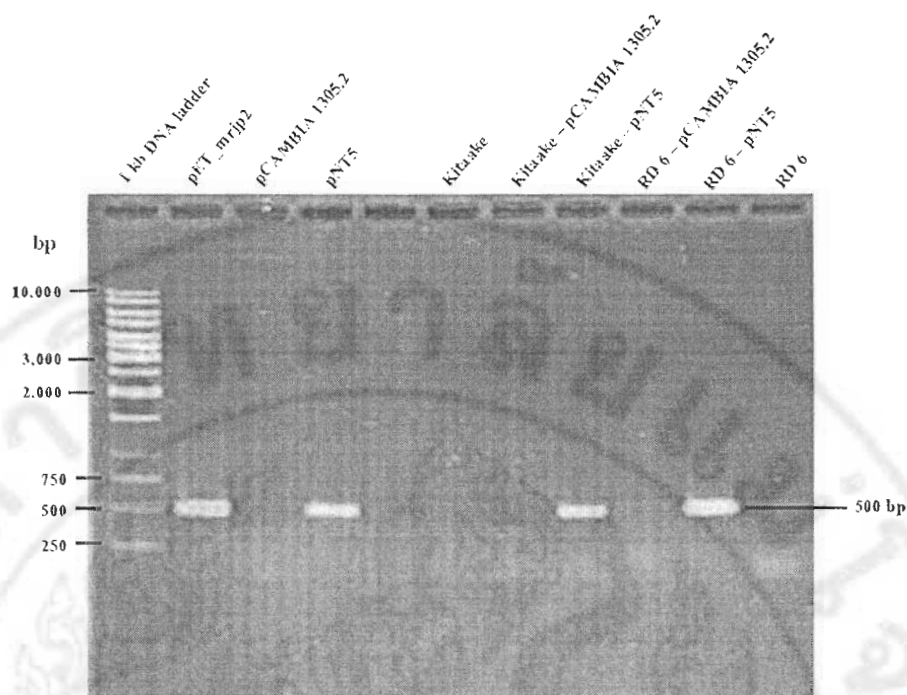
ในการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ทำการคัดเลือกแคลลัสที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ครั้งที่ 2 เป็นเวลานาน 10 วัน มาตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนนมผึ้ง และยีนต้านยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอของยีนต้านยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ขนาด 750 คู่เบส เป็นผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของแคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 (ภาพ 46) แสดงว่า การถ่ายยีนในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ประสบความสำเร็จ โดยแคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินแทรกอยู่ในจีโนม

นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนนมผึ้ง ขนาด 500 คู่เบส เป็นผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างดีเอ็นเอของแคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 แต่ไม่พบในตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากแคลลัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 (ภาพ 47) แสดงว่า การถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ประสบความสำเร็จ โดยมียีนโปรตีนนมผึ้งแทรกอยู่ในจีโนม



หมายเหตุ:	1 kb DNA Ladder	คือ DNA marker
	pET_mrjp2	คือ พลาสมิด pET_mrjp2 ซึ่งมียีน <i>mrjp2</i>
	pCambia 1305.2	คือ พลาสมิด pCambia 1305.2 ซึ่งมียีน <i>hptII</i>
	pNT5	คือ พลาสมิด pNT5 ซึ่งมียีน <i>mrjp2</i> และ <i>hptII</i>
	Kitaake	คือ แคลลัสข้าวพันธุ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน
	Kitaake - 1305.2	คือ แคลลัสข้าวพันธุ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCambia 1305.2
	Kitaake - pNT5	คือ แคลลัสข้าวพันธุ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5
	RD 6	คือ แคลลัสข้าวพันธุ กข 6 ที่ไม่ได้ถ่ายยีน
	RD 6 - 1305.2	คือ แคลลัสข้าวพันธุ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCambia 1305.2
	RD 6 - pNT5	คือ แคลลัสข้าวพันธุ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

ภาพ 46 การตรวจสอบแคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hptII*)



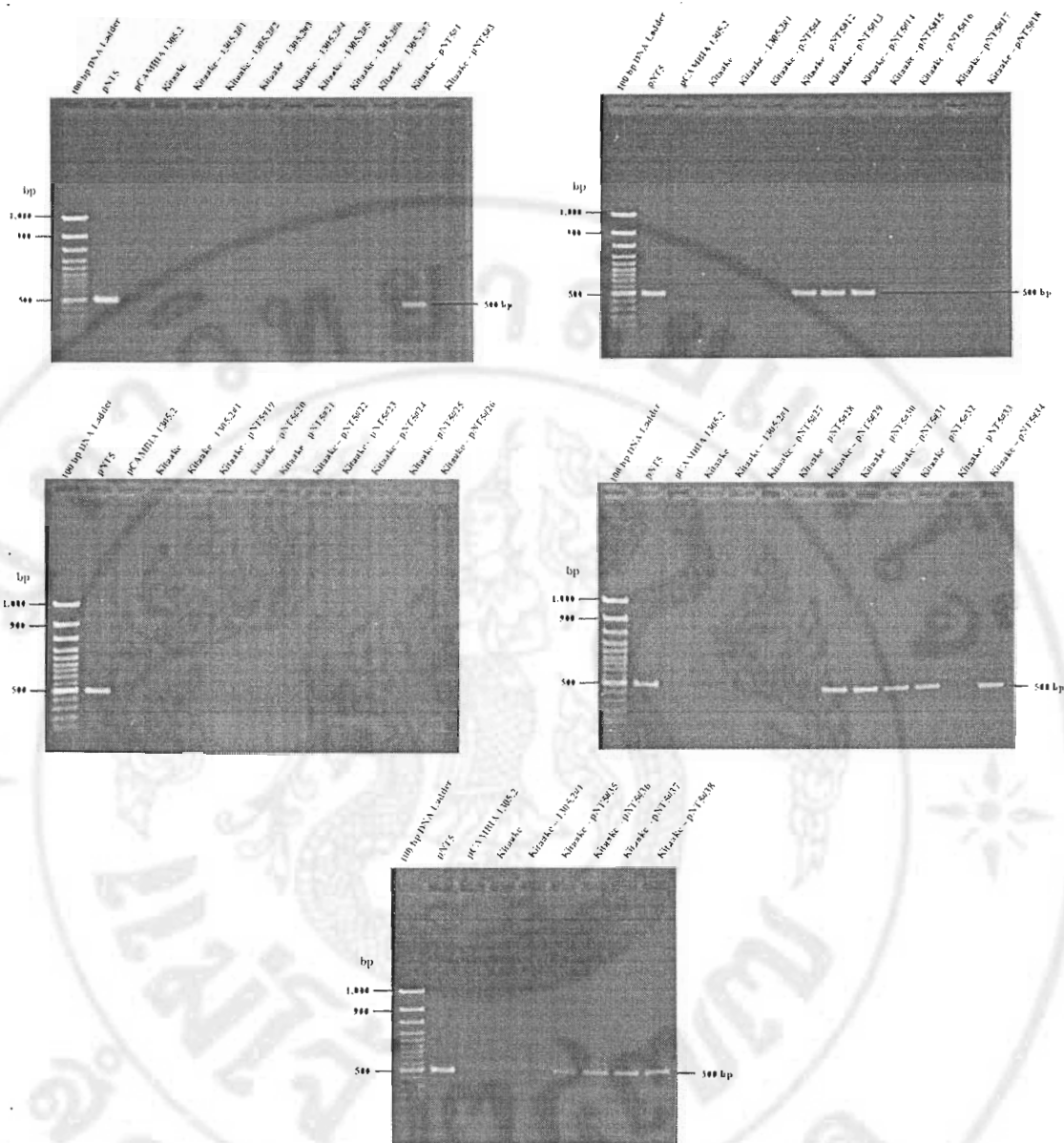
หมายเหตุ:	1 kb DNA Ladder	คือ DNA marker
	pET_mrjp2	คือ พลาสมิด pET_mrjp2 ซึ่งมียีน <i>mrjp2</i>
	pCAMBIA 1305.2	คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งมียีน <i>hptII</i>
	pNT5	คือ พลาสมิด pNT5 ซึ่งมียีน <i>mrjp2</i> และ <i>hptII</i>
	Kitaake	คือ แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน
	Kitaake - 1305.2	คือ แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2
	Kitaake - pNT5	คือ แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5
	RD 6	คือ แคลลัสข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ไม่ได้ถ่ายยีน
	RD 6 - 1305.2	คือ แคลลัสข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2
	RD 6 - pNT5	คือ แคลลัสข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5

ภาพ 47 การตรวจสอบแคลลัสที่เจริญได้นบนอาหารคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน โปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*)

## 1.2. การตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

เมื่อทำการปลูกต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งในโรงเรือน และทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase แล้ว จึงตรวจสอบการแทรกตัวของยีนโปรตีนนมผึ้งในจีโนมของข้าวตัดแปลงพันธุกรรม โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวที่ถ่ายยีนทั้ง 30 ต้น แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนนมผึ้งพบว่า ได้แถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนนมผึ้ง ขนาด 500 คู่เบส เป็นผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างดีเอ็นเอของใบข้าวจากต้นข้าว Kitaake – pNT5 จำนวน 13 ต้น ได้แก่ ต้นที่ 1, 12, 13, 14, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37 และ 38 ในขณะที่ไม่พบดีเอ็นเอดังกล่าวในผลผลิตพีซีอาร์จากต้นข้าว Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน และต้น Kitaake – 1305.2 ทั้ง 7 ต้น (ตาราง 7; ภาพ 48) แสดงว่า การถ่ายยีนประสบความสำเร็จ และมียีนโปรตีนนมผึ้งแทรกอยู่ในจีโนมของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 13 ต้น

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จะเห็นได้ว่า ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ทั้ง 9 ต้น (ต้นที่ 1, 12, 13, 14, 31, 32, 36, 37 และ 38) ได้แถบดีเอ็นเอของโปรตีนนมผึ้ง สอดคล้องกับผลการตรวจสอบเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ด้วยเทคนิค GUS assay แสดงว่า มีการแทรกตัวของ T-DNA ซึ่งประกอบด้วยยีนด้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hptII*) ยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) และยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase (*GUSPlus*) จากพลาสมิด pNT5 เข้าไปทั้งหมด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคดังกล่าวที่ผ่านมา ในขณะที่ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 อีก 4 ต้น (ต้นที่ 29, 30, 34 และ 35) ได้แถบดีเอ็นเอของโปรตีนนมผึ้ง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *GUSPlus* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค GUS assay แสดงว่า ส่วนของ T-DNA จากพลาสมิด pNT5 แทรกเข้าไปบางส่วน ซึ่งจะต้องทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ต่อไป



หมายเหตุ:	1 kb DNA Ladder	คือ DNA marker
	pNT5	คือ พลาสมิด pNT5 ซึ่งมียีน <i>mrjp2</i> และ <i>hptII</i>
	pCambia 1305.2	คือ พลาสมิด pCambia 1305.2 ซึ่งมียีน <i>hptII</i>
	Kitaake	คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน
	Kitaake - 1305.2 #1 - 7	คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCambia 1305.2 ต้นที่ 1 - 7
	Kitaake - pNT5#1 - 38	คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 48 การตรวจสอบต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*)

ตาราง 7 สรุปผลการตรวจสอบยีนโปรตีนนมผึ้งในจีโนมข้าวพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ต้นข้าว	ยีนโปรตีนนมผึ้งในจีโนม
Kitaake#1	-
Kitaake#2	-
Kitaake#3	-
Kitaake - 1305.2#1	-
Kitaake - 1305.2#2	-
Kitaake - 1305.2#3	-
Kitaake - 1305.2#4	-
Kitaake - 1305.2#5	-
Kitaake - 1305.2#6	-
Kitaake - 1305.2#7	-
Kitaake - pNT5#1	+
Kitaake - pNT5#3	-
Kitaake - pNT5#4	+
Kitaake - pNT5#12	+
Kitaake - pNT5#13	+
Kitaake - pNT5#14	+
Kitaake - pNT5#15	-
Kitaake - pNT5#16	-
Kitaake - pNT5#17	-
Kitaake - pNT5#18	-
Kitaake - pNT5#19	-
Kitaake - pNT5#20	-
Kitaake - pNT5#21	-
Kitaake - pNT5#22	-
Kitaake - pNT5#23	-
Kitaake - pNT5#24	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ต้นข้าว	ยีนโปรตีนนมผึ้งในจีโนม
Kitaake - pNT5#25	-
Kitaake - pNT5#26	-
Kitaake - pNT5#27	-
Kitaake - pNT5#28	-
Kitaake - pNT5#29	+
Kitaake - pNT5#30	+
Kitaake - pNT5#31	+
Kitaake - pNT5#32	+
Kitaake - pNT5#33	-
Kitaake - pNT5#34	+
Kitaake - pNT5#35	+
Kitaake - pNT5#36	+
Kitaake - pNT5#37	+
Kitaake - pNT5#38	+

หมายเหตุ: - คือ ไม่มียีน *mjrp2* ในจีโนม  
 + คือ มียีน *mjrp2* ในจีโนม  
 Kitaake #1 - 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ต้นที่ 1 - 3  
 Kitaake - 1305.2 #1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

## 2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้งในระดับ mRNA

### 2.1. การแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้งในใบข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

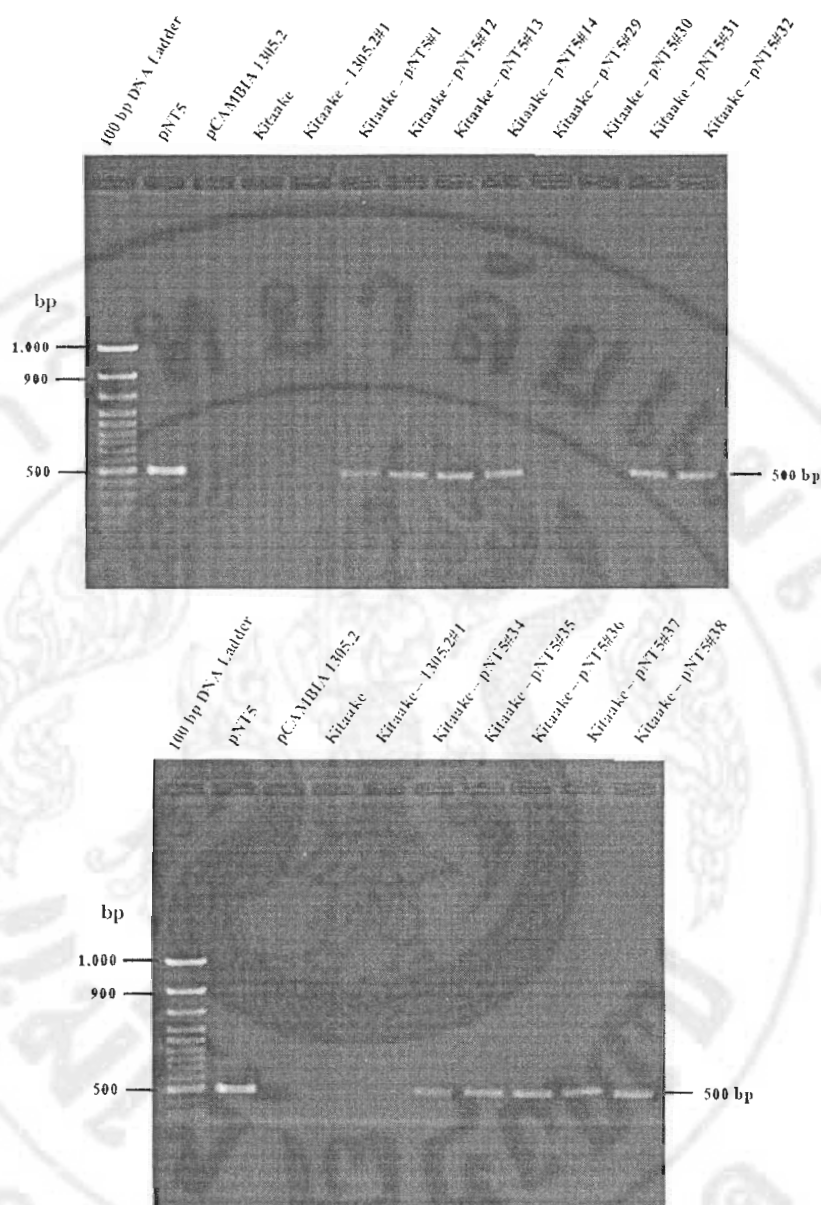
ทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน โปรตีนนมผึ้งแทรกอยู่ในจีโนม (ตรวจสอบแล้วด้วยเทคนิคพีซีอาร์) จากนั้นนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน โปรตีนนมผึ้ง พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอของยีน โปรตีนนมผึ้ง ขนาด 500 คู่เบส เป็นผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่าง อาร์เอ็นเอของใบข้าวจากข้าว Kitaake – pNT5 ต้นที่ 1, 12, 13, 14, 31, 32, 34, 35, 36, 37 และ 38 แต่ไม่พบในตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากต้นข้าว Kitaake ปกติ ต้น Kitaake – 1305.2 (ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2) และต้นข้าว Kitaake – pNT5 ต้นที่ 29 และ 30 (ภาพ 49) แสดงว่า เนื้อเยื่อใบข้าว Kitaake – pNT5 ต้นที่ 1, 12, 13, 14, 31, 32, 34, 35, 36, 37 และ 38 มีการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้งในระดับ mRNA

### 2.2. การแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้งในเมล็ดอ่อนข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

เมื่อต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน โปรตีนนมผึ้ง อยู่ในระยะ นำนม (milky stage) จึงทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อน อายุประมาณ 14 – 21 วัน จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน โปรตีนนมผึ้ง พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอของยีน โปรตีนนมผึ้ง ขนาด 500 คู่เบส เป็นผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างอาร์เอ็นเอของเมล็ดอ่อนจากต้นที่ 1, 12, 13, 14, 31, 32, 34, 35, 36, 37 และ 38 แต่ไม่พบในตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากต้นข้าว Kitaake ปกติ และต้น Kitaake – 1305.2 (ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2) (ภาพ 50) แสดงว่า มีการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้งระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าว ซึ่งอยู่ในระยะสืบพันธุ์ (reproductive stage)

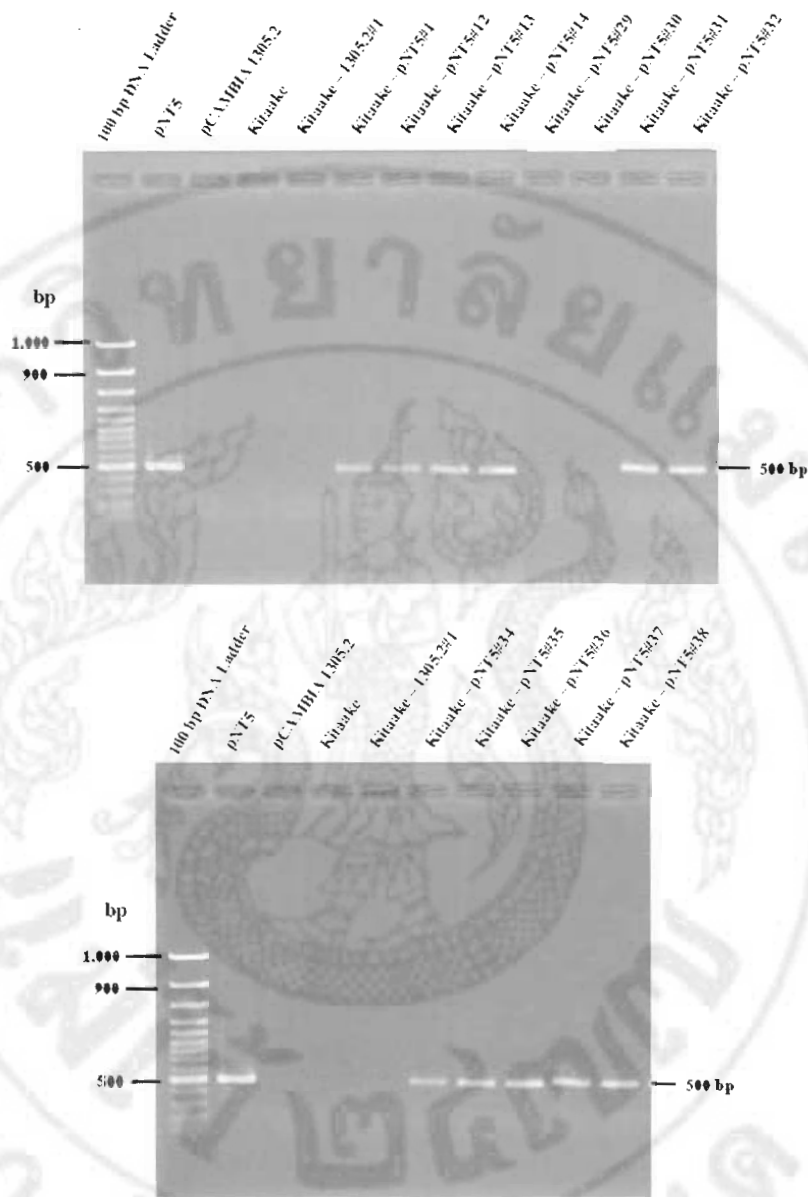
จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้งด้วยเทคนิค RT – PCR จะเห็นได้ว่าต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ทั้ง 11 ต้น (ต้นที่ 1, 12, 13, 14, 31, 32, 34, 35, 36, 37 และ 38) ได้แถบดีเอ็นเอของโปรตีนนมผึ้ง สอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แสดงว่า มียีน โปรตีนนมผึ้งซึ่งสามารถแสดงออกในระดับ mRNA ได้ทั้งในส่วนของใบและเมล็ดอ่อน ในขณะที่ต้นข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 อีก 2 ต้น (ต้นที่ 29 และ 30) ไม่ได้แถบดีเอ็นเอของโปรตีนนมผึ้งทั้งในใบและเมล็ดอ่อน แสดงว่า ยีน โปรตีนนมผึ้งที่แทรกอยู่ในจีโนม ไม่มีการแสดงออกในระดับ mRNA จึงไม่ทำการตรวจสอบในระดับโปรตีน





- หมายเหตุ:
- |                        |   |
|------------------------|---|
| 1 kb DNA Ladder        | คือ DNA marker  |
| pNT5                   | คือ พลาสมิด pNT5 ซึ่งมียีน <i>mrjp2</i> และ <i>hptII</i>                |
| pCAMBIA 1305.2         | คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งมียีน <i>hptII</i>                       |
| Kitaake                | คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน                              |
| Kitaake - 1305.2 #1    | คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 |
| Kitaake - pNT5 #1 - 38 | คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38      |

ภาพ 49 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ในระดับ mRNA ในใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT - PCR



หมายเหตุ: 1 kb DNA Ladder คือ DNA marker  
 pNT5 คือ พลาสมิด pNT5 ซึ่งมียีน *mrjp2* และ *hptII*  
 pCAMBIA 1305.2 คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ซึ่งมียีน *hptII*  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake- 1305.2 #1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1-38

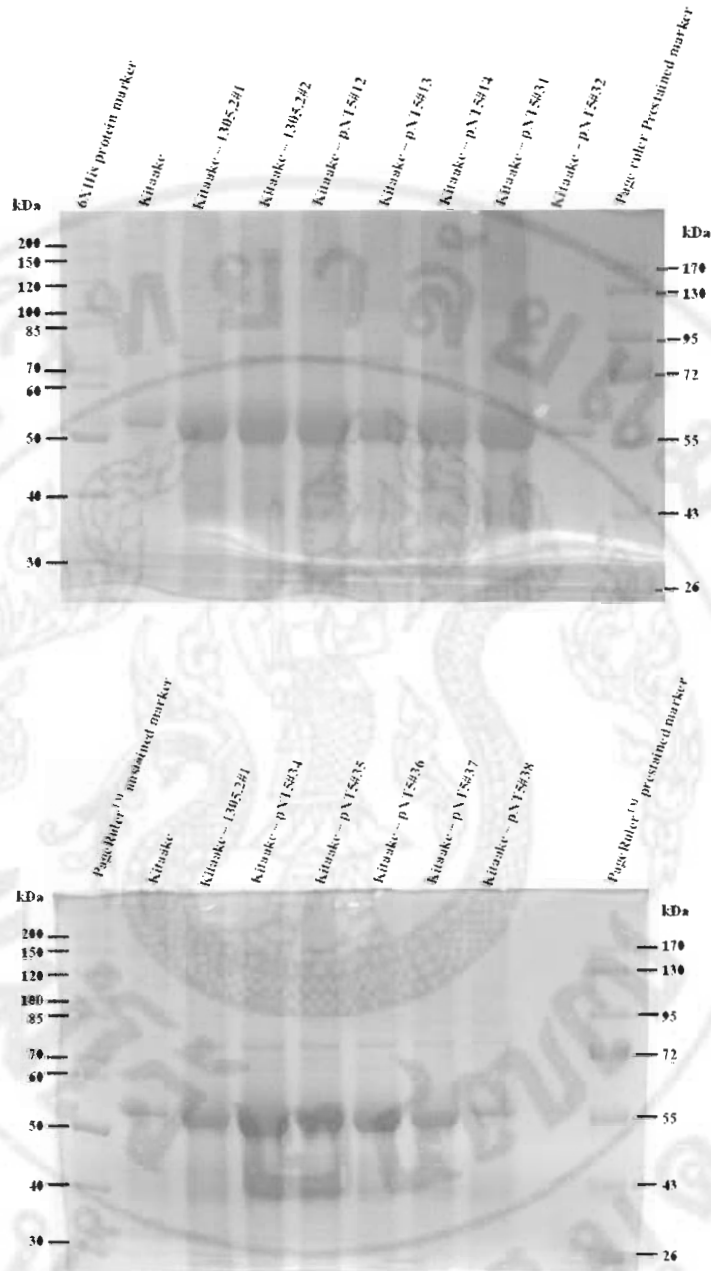
ภาพ 50 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน โปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT - PCR

### 3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในระดับโปรตีน

#### 3.1. การตรวจสอบโปรตีนนมผึ้งในใบข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

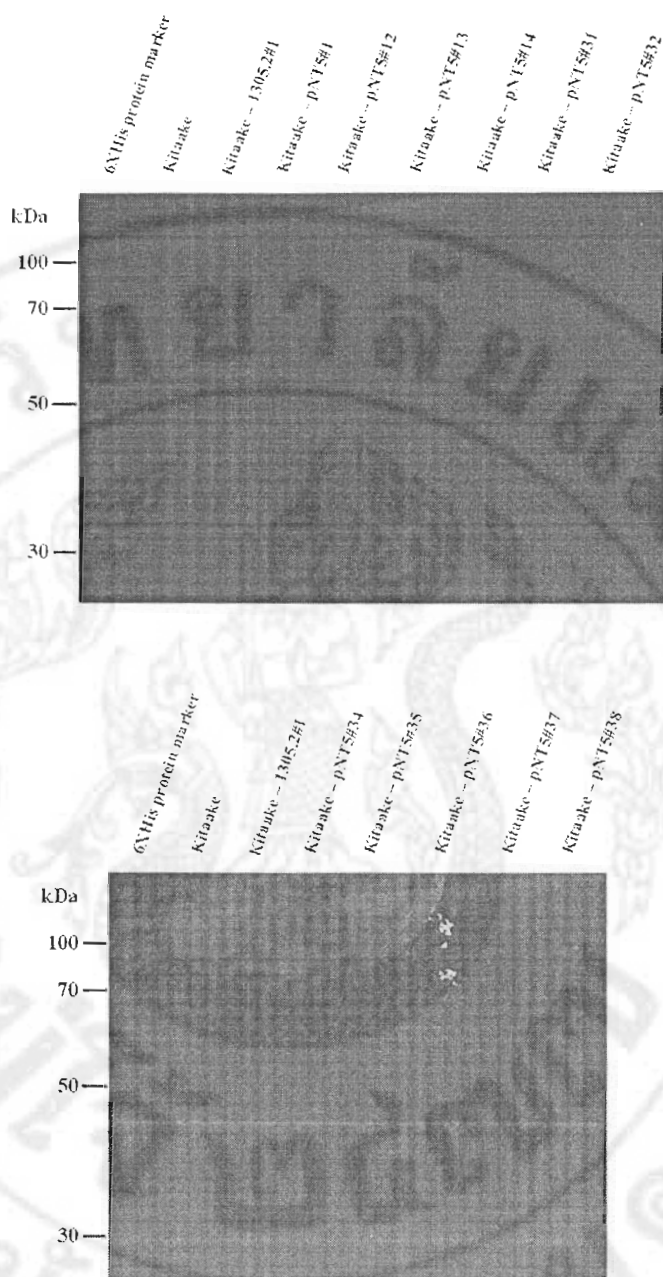
เนื่องจากยีนโปรตีนนมผึ้งที่ถ่ายเข้าไปในข้าวมีการควบคุมการทำงานด้วยโปรโมเตอร์ชนิด 35S dual enhancer ทำให้ยีนมีการแสดงออกอย่างสูงตลอดเวลาในทุกเนื้อเยื่อ การตรวจสอบโปรตีนนมผึ้งในใบข้าวจึงเป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงทำการสกัดโปรตีนจากใบข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนโปรตีนนมผึ้ง แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค SDS - PAGE พบว่า ในใบข้าวมีโปรตีนขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน (kDa) อยู่เป็นส่วนใหญ่ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจน คาดว่า เป็น catalytic large subunit ของเอนไซม์ Rubisco (Andersson and Backlund, 2008) ส่วนโปรตีนขนาดอื่น ๆ มีปริมาณเล็กน้อย (ภาพ 51)

เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนซึ่งมีลำดับเป็นกรดอะมิโน Histidine (6xHis - tag) พบว่า ได้แถบโปรตีนขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน ในตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากใบข้าว Kitaake - 1305.2#1 ในขณะที่ไม่พบในตัวอย่างโปรตีนจากใบข้าวปกติ และใบข้าวที่มียีนโปรตีนนมผึ้ง (ภาพ 52) คาดว่า โปรตีนที่ตรวจพบเป็นเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase ซึ่งมีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน และเป็นผลผลิตของยีน *GUSPlus* ที่มีบริเวณ 6x His - tag อยู่ที่ปลายด้านคาร์บอกซิล (C - terminal) ของโปรตีน ทำให้สามารถตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดีชนิด Anti - His HRP conjugate (QIAGEN, USA) และสอดคล้องกับการทดลองของ Nguyen (2002) ซึ่งได้ทำการทดลองในข้าว และสามารถตรวจสอบโปรตีน *GUSPlus* ด้วยแอนติบอดีชนิด Anti - His HRP conjugate (QIAGEN, USA) และได้ขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตันเช่นเดียวกัน



หมายเหตุ: PageRuler™ unstained protein ladder และ PageRuler™ prestained Ladder คือโปรตีนมาตรฐาน  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake – 1305.2#1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake – pN15 #1 – 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pN15 ต้นที่ 1 – 38

ภาพ 51. การตรวจสอบโปรตีนในใบของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุ์กรรมด้วยเทคนิค SDS – PAGE



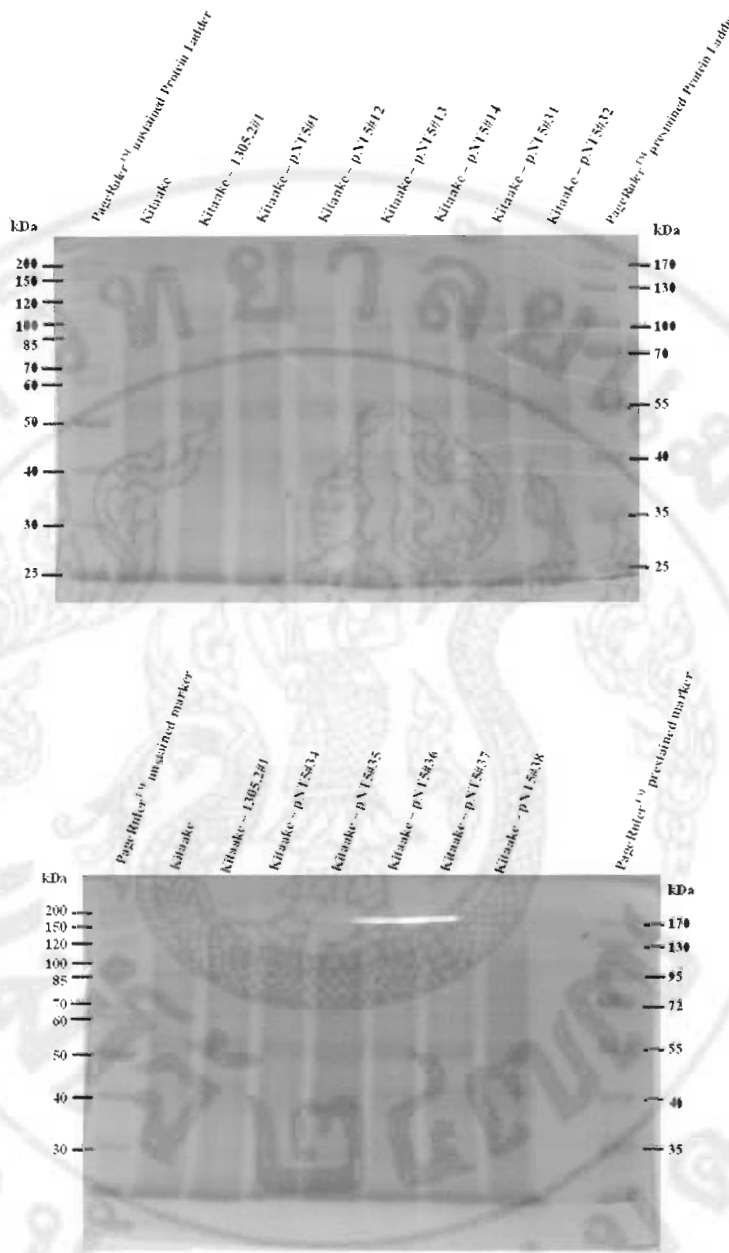
- หมายเหตุ: 6XHis protein marker คือ โปรตีนมาตรฐานที่มี 6x Histidine  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake - 1305.2 #1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 52 การตรวจสอบโปรตีนในใบของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Western blot

### 3.2. การตรวจสอบโปรตีนนมผึ้งในเมล็ดอ่อนของข้าวคัดแปลงพันธุกรรม

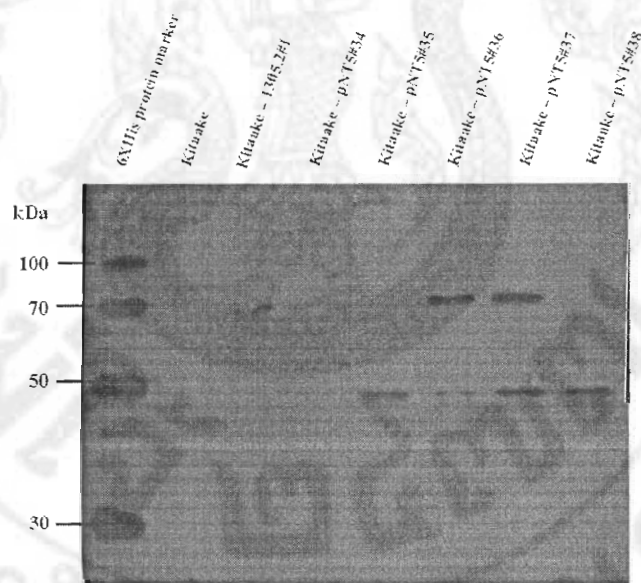
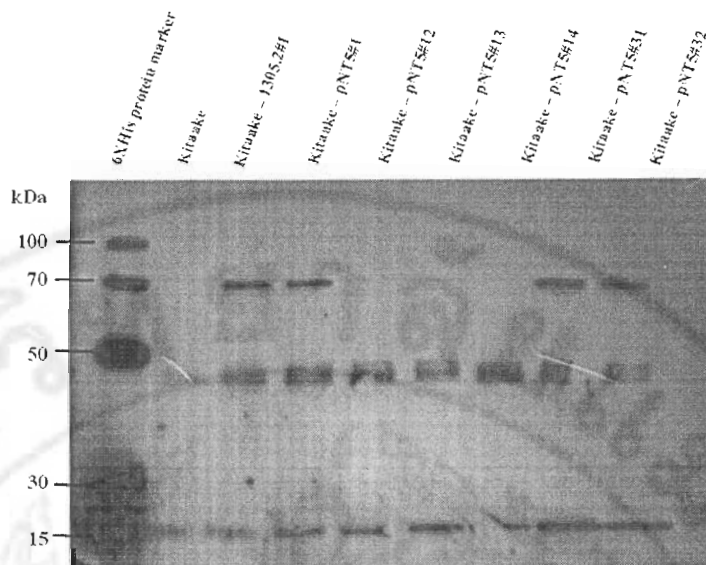
ในการยีนโปรตีนนมผึ้ง เพื่อปรับปรุงคุณภาพของเมล็ดข้าว โดยมีการควบคุมการทำงานด้วยโปรโมเตอร์ 35S dual enhancer จึงต้องมีการตรวจสอบการสร้างโปรตีนในเมล็ด ดังนั้นจึงทำการสกัดโปรตีนจากเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนโปรตีนนมผึ้ง แล้วตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS – PAGE พบว่า ในเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kitaake มีโปรตีนขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน คาดว่าเป็น large subunits ของโปรตีน glutelin และแถบโปรตีนขนาดประมาณ 55 – 60 กิโลดาลตัน (Yamagata et al., 1982; Wen and Luthe, 1985) ซึ่งพบได้ในเมล็ดอ่อนที่กำลังพัฒนาส่วนโปรตีนขนาดอื่น ๆ มีปริมาณเล็กน้อย (ภาพ 53)

เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนซึ่งมีลำดับเป็นกรดอะมิโน Histidine (6xHis – tag) พบว่า พบแถบโปรตีนขนาด 70 กิโลดาลตัน ในตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากเมล็ดอ่อนข้าว Kitaake – pNT5 ต้นที่ 1, 31, 32, 36 และ 37 เช่นเดียวกับที่พบในตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากเมล็ดอ่อนของข้าว Kitaake – 1305.2#1 แต่ไม่พบในตัวอย่างโปรตีนจากเมล็ดอ่อนของข้าวปกติ (ภาพ 54) จึงคาดว่า โปรตีนที่ตรวจพบในเมล็ดอ่อนของข้าว Kitaake – pNT5 ต้นที่ 1, 31, 32, 36 และ 37 เป็นเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ซึ่งได้จากยีน *GUSPlus* เนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบ non – specific protein ขนาดประมาณ 15 และ 50 กิโลดาลตัน ในตัวอย่างโปรตีนจากต้นข้าว Kitaake ทุกต้นทั้งที่เป็นต้นข้าวปกติและข้าวคัดแปลงพันธุกรรม (ภาพ 54) คาดว่าเป็นโปรตีน prolamin ซึ่งมีขนาดประมาณ 13 – 17 กิโลดาลตัน (Wu et al., 1998; Huang, 2004) รวมทั้ง precursor และ large subunits ของโปรตีน glutelin ขนาดประมาณ 45 – 50 กิโลดาลตัน ซึ่งพบได้ในเมล็ดอ่อนที่กำลังพัฒนา (Yamagata et al., 1982; Wen and Luthe, 1985; Liu et al., 1995; Wu et al., 1998; Huang, 2004)



หมายเหตุ: PageRuler™ unstained protein ladder และ PageRuler™ prestained Ladder คือ protein marker  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake - 1305.2#1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 53 การตรวจสอบ โปรตีนในเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค SDS - PAGE



- หมายเหตุ: 6XHis protein marker คือ โปรตีนมาตรฐาน  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake - 1305.2#1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 54 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดอ่อนของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Western blot



### 3.3. การตรวจสอบโปรตีนนมผึ้งในเมล็ดแก่ข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแก่ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนโปรตีนนมผึ้ง แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค SDS - PAGE พบว่า ในเมล็ดแก่ของข้าวมีโปรตีนขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตัน (kDa) อยู่เป็นส่วนใหญ่ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจน แต่น้อยกว่าในใบข้าว ส่วนโปรตีนขนาดอื่น ๆ มีปริมาณเล็กน้อย (ภาพ 55)

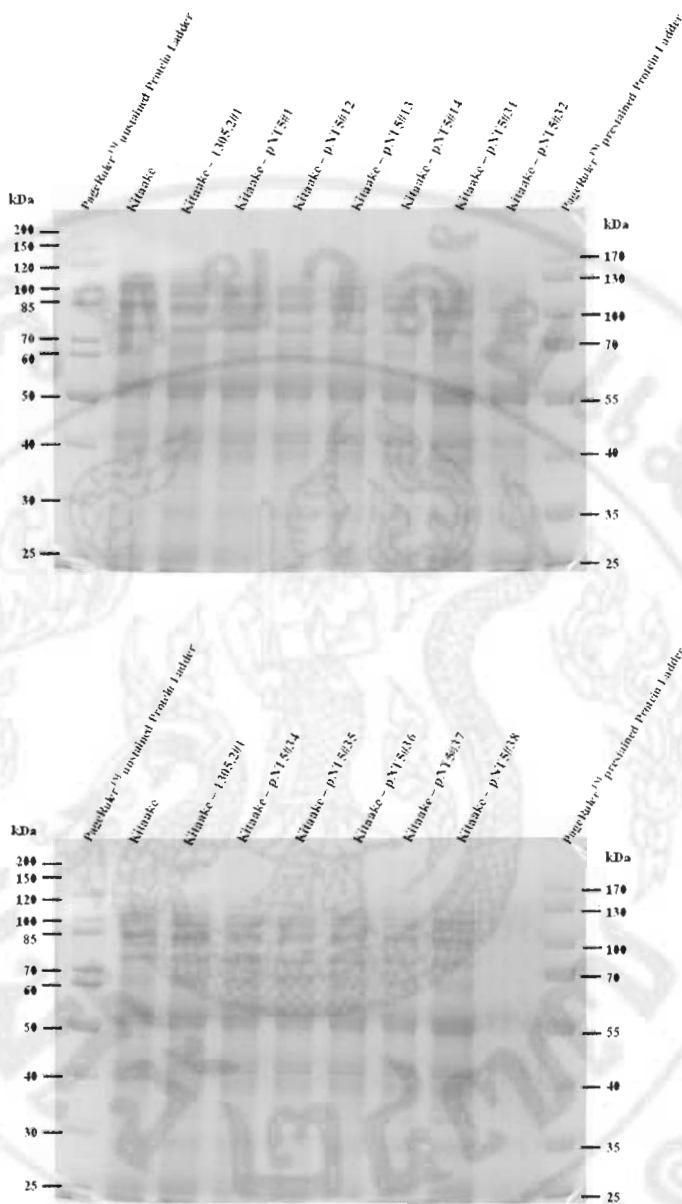
เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนซึ่งมีลำดับเป็นกรดอะมิโน Histidine (6xHis - tag) พบว่า ได้โปรตีนขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน ในตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากเมล็ดแก่ข้าว Kitaake - 1305.2#1 ในขณะที่ไม่พบในตัวอย่างโปรตีนจากเมล็ดแก่ข้าวปกติ และข้าวที่มียีนโปรตีนนมผึ้ง (ภาพ 56) จึงคาดว่า โปรตีนที่ตรวจพบในเมล็ดแก่ของข้าว Kitaake - pNT5 ต้นที่ 31 เป็นเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase ซึ่งได้จากยีน *GUSPlus* เนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังได้แถบโปรตีนขนาดประมาณ 30 และ 50 กิโลดาลตันในโปรตีนจากทุกตัวอย่าง เป็น non - specific protein ที่มีบริเวณ 6xHis หรือมี Histidine หลายตัวเรียงติดกัน ซึ่งอาจพบได้ในเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ทั่วไป คาดว่าเป็น precursor รวมทั้ง small และ large subunits ของโปรตีน glutelin ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 28 - 50 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ในเมล็ดของข้าวหลายสายพันธุ์ (Yamagata et al., 1982; Wen and Luthe, 1985; Liu et al., 1995; Wu et al., 1998; Huang, 2004)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนในใบ เมล็ดอ่อน และเมล็ดแก่ของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้แอนติบอดีชนิด Anti - His HRP conjugate (QIAGEN, USA) ที่จำเพาะต่อ Histidine tag protein ซึ่งสามารถตรวจสอบโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Histidine เรียงต่อกัน จำนวน 3 - 6 กรดอะมิโน ทำให้เกิดการจับกับโปรตีนได้หลากหลาย แต่ถ้าหากมีการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน MRJP2 อาจจะตรวจได้ดีกว่าเนื่องจากมีความไว (sensitivity) ต่อโปรตีน MRJP2 สูงกว่าการใช้แอนติบอดีต่อ Histidine tag protein เช่นเดียวกับการทดลองของ Júdová และคณะ (2004) ซึ่งได้ทำการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งชนิด MRJP1 เข้าสู่ยาสูบ และใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน MRJP1 ในการตรวจสอบ ทำให้สามารถตรวจสอบโปรตีน MRJP1 ได้

นอกจากนี้การตรวจไม่พบโปรตีนนมผึ้ง (MRJP2) ในต้นข้าวซึ่งมีการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA อาจเกิดจากความเสถียรของ mRNA (mRNA stability) จากยีน *mrjp2* ต่ำ ทำให้เกิดการสลายตัวในเซลล์ได้ ทำให้เกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีนได้น้อย หรืออาจเกิดจากการเลือกใช้โคดอน (codon usage) ของเซลล์ข้าวแตกต่างจากโคดอนของผึ้ง ทำให้โปรตีนที่สร้างได้ไม่สมบูรณ์

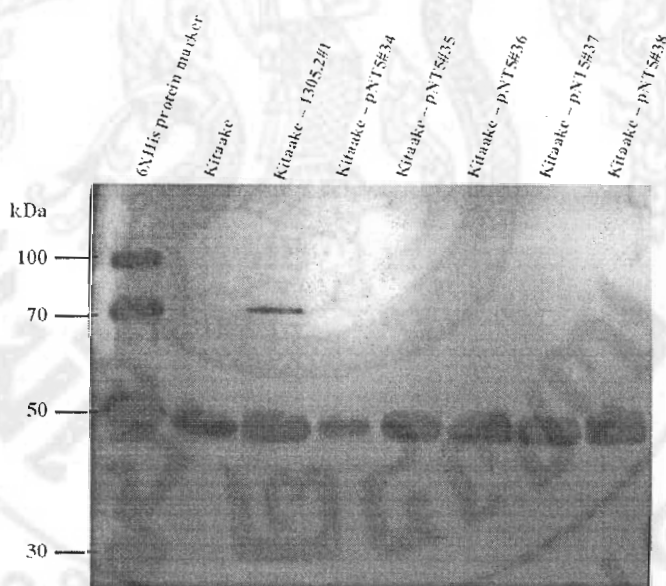
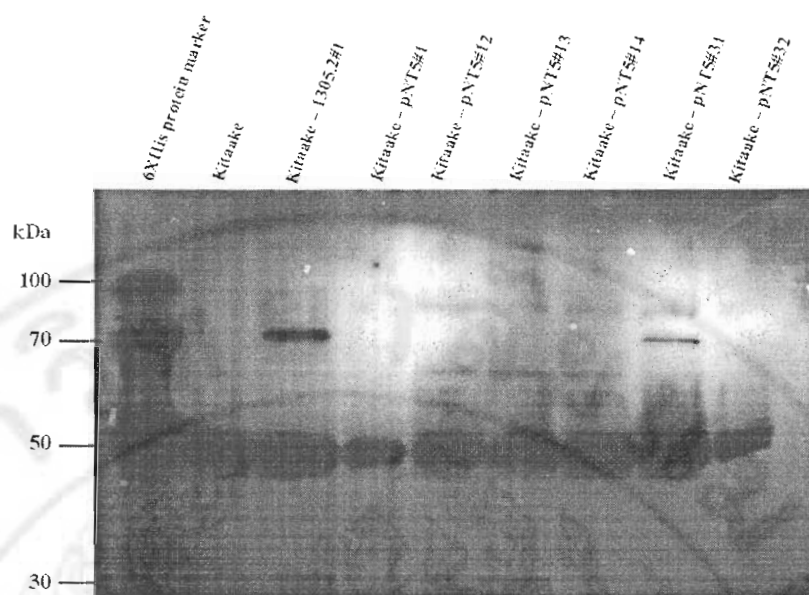
จึงถูกทำลายโดยกระบวนการภายในเซลล์ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดีชนิด Anti – His HRP conjugate ได้

จากการวิเคราะห์ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมซึ่งถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้ง ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า มีต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 5 ต้น ได้แก่ ต้นข้าว Kitaake – pNT5 ต้นที่ 1, 31, 32, 36 และ 37 ซึ่งมียีน *mrjp2* แทรกอยู่ในจีโนม และมีการแสดงออกในระดับ mRNA อีกทั้งยังมีการแสดงออกของยีน *GUSPlus* ระดับโปรตีนในใบและเมล็ดอ่อน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค GUS assay และ Western blot ตามลำดับ (ตาราง 10) ซึ่งเป็นต้นที่ควรนำไปทำการวิเคราะห์ด้านสัณฐานวิทยาและการถ่ายทอดยีนในรุ่น T<sub>2</sub> ต่อไป



หมายเหตุ: PageRuler™ unstained protein ladder และ PageRuler™ prestained Ladder คือ protein marker  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake - 1305.2#1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 55 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดแก่ของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค SDS - PAGE



หมายเหตุ: 6XHis protein marker คือ protein marker  
 Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake - 1305.2#1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 56 การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดแก่ของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Western blot

ตาราง 8 สรุปผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ในข้าว Kitaake  
ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *mrjp2* แทรกอยู่ในจีโนม ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ต้นข้าว	การแสดงออกของยีน		การแสดงออกของยีน		
	ในระดับ mRNA		ในระดับโปรตีน		
	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่
Kitaake	-	-	-	-	-
Kitaake – 1305.2#1	-	-	-	-	-
Kitaake – pNT5#1	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#12	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#13	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#14	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#29	-	-	ND	ND	ND
Kitaake – pNT5#30	-	-	ND	ND	ND
Kitaake – pNT5#31	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#32	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#34	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#35	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#36	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#37	+	+	-	-	-
Kitaake – pNT5#38	+	+	-	-	-

หมายเหตุ: - คือ ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน  
+ คือ ตรวจพบการแสดงออกของยีน  
ND คือ ไม่ได้ทำการตรวจสอบ  
Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
Kitaake – 1305.2 #1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
Kitaake – pNT5 #1 – 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 – 38

ตาราง 9 สรุปผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase (*gusA*) ใน  
ข้าว Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *mrjp2* แทรกอยู่ในจีโนมด้วยเทคนิค Western blot

ต้นข้าว	การแสดงออกของยีน ในระดับโปรตีน		
	ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่
Kitaake	-	-	-
Kitaake - 1305.2#1	+++	+++	+++
Kitaake - pNT5#1	-	+++	-
Kitaake - pNT5#12	-	-	-
Kitaake - pNT5#13	-	-	-
Kitaake - pNT5#14	-	-	-
Kitaake - pNT5#31	-	+++	++
Kitaake - pNT5#32	-	-	-
Kitaake - pNT5#34	-	-	-
Kitaake - pNT5#35	-	-	-
Kitaake - pNT5#36	-	+	-
Kitaake - pNT5#37	-	+	-
Kitaake - pNT5#38	-	-	-

หมายเหตุ: - คือ ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน  
+ คือ ตรวจพบการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ  
++ คือ ตรวจพบการแสดงออกของยีนในระดับปานกลาง  
+++ คือ ตรวจพบการแสดงออกของยีนในระดับสูง  
Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
Kitaake - 1305.2 #1 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด  
pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1  
Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้น  
ที่ 1 - 38

ตาราง 10 สรุปผลการตรวจสอบข่าวดีดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิคชีวโมเลกุล

ต้นข้าว	พลาสมิด	การ แสดงออก ของยีน <i>GUSPlus</i> <sup>1</sup>	การแสดงผลของยีน <i>GUSPlus</i> ใน ระดับโปรตีน <sup>2</sup>			ยีน <i>mrip2</i> ในจีโนม <sup>3</sup>			การแสดงผลของยีน <i>mrip2</i> ในระดับ mRNA <sup>2</sup>			การแสดงผลของยีน <i>mrip2</i> ใน ระดับโปรตีน <sup>2</sup>		
			ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่	ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่	ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่	ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่
Kitaake#1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kitaake#2	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake#3	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - 1305.2#1	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kitaake - 1305.2#2	+++	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - 1305.2#3	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - 1305.2#4	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - 1305.2#5	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - 1305.2#6	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - 1305.2#7	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNT5#1	+	-	+++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kitaake - pNT5#3	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNT5#4	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNT5#12	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

ตาราง 10 (ต่อ)

ต้นข้าว	พลาสมิด	การแสดงออกของยีน <i>GUSPlus</i> <sup>1</sup>	การแสดงออกของยีน <i>GUSPlus</i> ในระดับโปรตีน <sup>2</sup>		ยีน <i>mirjp2</i> ในจีโนม <sup>3</sup>		การแสดงออกของยีน <i>mirjp2</i> ในระดับ mRNA <sup>2</sup>		การแสดงออกของยีน <i>mirjp2</i> ในระดับโปรตีน <sup>2</sup>	
			+	-	+	-	+	-	+	-
			ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ
Kitaake - pNTS#13	pNTS	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Kitaake - pNTS#14	pNTS	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Kitaake - pNTS#15	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#16	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#17	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#18	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#19	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#20	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#21	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#22	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#23	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#24	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#25	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Kitaake - pNTS#26	pNTS	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND



ตาราง 10 (ต่อ)

ต้นข้าว	พลาสมิด	การ แสดงออก ของยีน <i>GUSPlus</i> <sup>1</sup>	การแสดงออกของยีน <i>GUSPlus</i> ใน		ยีน <i>mrip2</i> ในจีโนม <sup>3</sup>		การแสดงออกของยีน <i>mrip2</i> ในระดับ mRNA <sup>2</sup>		การแสดงออกของยีน <i>mrip2</i> ใน ระดับโปรตีน <sup>2</sup>		
			ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ	เมล็ดอ่อน
			ใบ	เมล็ดอ่อน	เมล็ดแก่	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ	เมล็ดอ่อน	ใบ	เมล็ดอ่อน
Kitaake - pNTS#27	pNTS	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	
Kitaake - pNTS#28	pNTS	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	
Kitaake - pNTS#29	pNTS	-	ND	ND	+	-	-	ND	ND	ND	
Kitaake - pNTS#30	pNTS	-	ND	ND	+	-	-	ND	ND	ND	
Kitaake - pNTS#31	pNTS	+	+++	++	+	+	+	-	-	-	
Kitaake - pNTS#32	pNTS	+	-	-	+	+	+	-	-	-	
Kitaake - pNTS#33	pNTS	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	
Kitaake - pNTS#34	pNTS	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
Kitaake - pNTS#35	pNTS	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
Kitaake - pNTS#36	pNTS	++	-	+	+	+	+	-	-	-	
Kitaake - pNTS#37	pNTS	++	+	-	+	+	+	-	-	-	
Kitaake - pNTS#38	pNTS	++	-	-	+	+	+	-	-	-	

หมายเหตุ: <sup>1</sup> คือ ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค GUS assay

<sup>2</sup> คือ ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot

<sup>3</sup> คือ ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

<sup>4</sup> คือ ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR

Kitaake  
หรือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ย้อม

Kitaake - 1305.2 #1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA

1305.2 ต้นที่ 1 - 7

Kitaake - pNTS #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 - 38

## การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวญี่ปุ่น พันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

การศึกษาการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าว Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ โดยได้ทำการปลูกข้าว Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 และ pNT5 รุ่น T<sub>0</sub> ได้แก่ ต้นข้าว Kitaake - 1305.2 และ Kitaake - pNT5 ตามลำดับ ซึ่งได้จากการชักนำให้เกิดต้นด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เปรียบเทียบกับข้าว Kitaake ปกติที่ไม่ได้ถ่ายยีน ทำการปลูกโดยการเพาะเมล็ด และปลูกลงดินพร้อมกัน แล้วจึงทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนกอดต่อต้น วันออกดอก จำนวนช่อดอกต่อต้น จำนวนรวงต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อรวง และน้ำหนักเมล็ด

จากการศึกษา พบว่า ต้นข้าว Kitaake ปกติมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม Kitaake - 1305.2 และ Kitaake - pNT5 (ตาราง 11, ภาพ 58) ส่วนการศึกษาจำนวนกอดของต้นข้าว Kitaake พบว่า ต้นข้าว Kitaake ปกติมีจำนวนกอดมากกว่าต้นข้าว Kitaake - 1305.2 และ Kitaake - pNT5 ทำให้ต้นข้าวปกติมีจำนวนช่อดอกและจำนวนรวงมากกว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (ตาราง 11, ภาพ 59, 61 และ 62) แต่ต้นข้าวปกติและต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีวันออกดอกที่ใกล้เคียงกัน ประมาณ 42 - 58 วัน (ตาราง 11, ภาพ 60) อาจเนื่องมาจากต้นข้าว Kitaake ปลูกเติบโตมาจากการเพาะเมล็ด ในขณะที่ต้นข้าว Kitaake - 1305.2 และ Kitaake - pNT5 ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงมีความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมปกติที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการศึกษาผลผลิตพบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมบางต้นมีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าต้นข้าวปกติ (ตาราง 12, ภาพ 63) โดยต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมบางต้นมีน้ำหนักเมล็ดมากกว่าต้นข้าวปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นข้าว Kitaake - pNT5 ต้นที่ 4 มีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุด เท่ากับ 43.0 มิลลิกรัมต่อเมล็ด รองลงมา คือ ต้นข้าว Kitaake - pNT5 ต้นที่ 1 เท่ากับ 41.0 มิลลิกรัมต่อเมล็ด (ตาราง 12, ภาพ 64) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนในเมล็ดแก่ทั้งหมดของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมบางต้นมีปริมาณมากกว่าโปรตีนในเมล็ดแก่ทั้งหมดของข้าวปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นข้าว Kitaake - pNT5 ต้นที่ 27 และ 28 มีโปรตีนในเมล็ดมากที่สุด เท่ากับ 2.53 และ 2.78 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ต้นข้าว Kitaake ต้นที่ 3 มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดน้อยที่สุด เท่ากับ 1.67 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยคิดเป็นปริมาณโปรตีนเท่ากับ ร้อยละ 0.25, .28 และ 0.17 ตามลำดับ (ตาราง 12, ภาพ 65)

จากการศึกษาน้ำหนักเมล็ดและปริมาณ โปรตีนทั้งหมดในเมล็ด คาดว่าน้ำหนักเมล็ดที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากการผลิต โปรตีนที่เป็นผลจากการแสดงออกของยีนที่ทำการถ่ายยีนเข้าไปในข้าว ทำให้น้ำหนักเมล็ดของต้นข้าว Kitaake – 1305.2 และ Kitaake – pNT5 บางต้นเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นข้าวปกติ ทั้งนี้ยังต้องทำการศึกษากายภาพของต้นข้าวและเปรียบเทียบในต้นข้าวรุ่น  $T_1$  ต่อไป



ภาพ 57 การปลูกต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ Kitaake รุ่น  $T_0$  เปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ

ตาราง 11 การเปรียบเทียบลักษณะต้นตอ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มขึ้น	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนกอ (กอ)	วันออกดอก (วัน)	จำนวนช่อดอก (ช่อ)	จำนวนรวง (รวง)
Kitaake#1	-	-	40.1	23	55	28	26
Kitaake#2	-	-	55.7	12	55	11	4
Kitaake#3	-	-	45.2	5	52	3	5
Kitaake - 1305.2#1	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	40.1	20	57	32	28
Kitaake - 1305.2#2	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	28.5	12	54	13	10
Kitaake - 1305.2#3	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	25.7	9	49	8	9
Kitaake - 1305.2#4	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	30.7	11	53	5	2
Kitaake - 1305.2#5	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	32.4	10	50	4	2
Kitaake - 1305.2#6	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	24.5	11	47	5	3
Kitaake - 1305.2#7	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	23.4	8	42	4	3
Kitaake - pNT5#1	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	30.5	45	53	33	27
Kitaake - pNT5#3	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	32.9	17	56	9	8
Kitaake - pNT5#4	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	51.3	11	54	11	8
Kitaake - pNT5#12	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	45.9	11	52	13	11

ตาราง 11 (ต่อ)

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มเข้า	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนกอ (กอ)	วันออกดอก (วัน)	จำนวนช่อดอก (ช่อ)	จำนวนรวง (รวง)
Kitaake - pNTS#13	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	47.5	12	52	13	9
Kitaake - pNTS#14	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	48	8	52	8	8
Kitaake - pNTS#15	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	48.5	7	52	12	8
Kitaake - pNTS#16	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	43.4	6	52	8	4
Kitaake - pNTS#17	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	40.3	19	52	22	12
Kitaake - pNTS#18	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	42.5	13	52	11	9
Kitaake - pNTS#19	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	32.1	18	49	15	8
Kitaake - pNTS#20	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	34.2	4	52	4	3
Kitaake - pNTS#21	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	30.9	11	49	11	7
Kitaake - pNTS#22	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	32.7	17	49	17	5
Kitaake - pNTS#23	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	31.5	14	51	5	4
Kitaake - pNTS#24	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	35.2	8	49	8	4
Kitaake - pNTS#25	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	31.7	21	54	11	5
Kitaake - pNTS#26	pNTS	<i>hptII, gusA, mrip2</i>	28.3	23	50	15	5

ตาราง 11 (ต่อ)

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มขึ้น	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนกอ (กอ)	วันออกดอก (วัน)	จำนวนช่อดอก (ช่อ)	จำนวนรวง (รวง)
Kitaake - pNT5#27	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	29.5	18	49	19	6
Kitaake - pNT5#28	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	31.8	3	58	4	4
Kitaake - pNT5#29	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	29.7	6	50	3	2
Kitaake - pNT5#30	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	27.5	6	52	6	4
Kitaake - pNT5#31	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	28.7	4	51	2	2
Kitaake - pNT5#32	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	29.1	3	52	2	2
Kitaake - pNT5#33	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	30.3	9	53	5	4
Kitaake - pNT5#34	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	31.6	6	55	2	2
Kitaake - pNT5#35	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	31.4	10	53	4	3
Kitaake - pNT5#36	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	26.7	14	48	5	3
Kitaake - pNT5#37	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	27.1	11	46	4	4
Kitaake - pNT5#38	pNT5	<i>hptII, gusA, nrj2</i>	26.4	9	48	6	6

หมายเหตุ: Kitaake#1 - 3

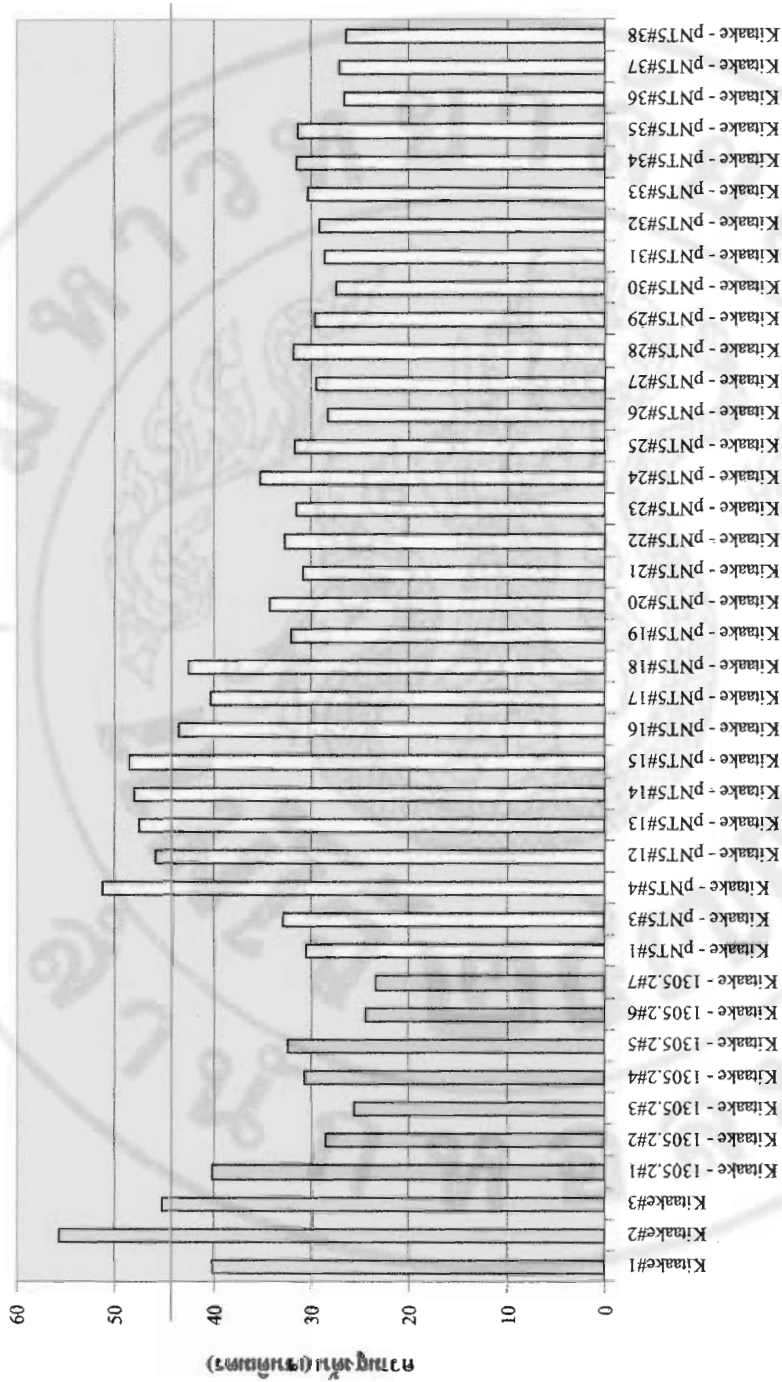
คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ต้นที่ 1 - 3

Kitaake - 1305.2 #1 - 7

คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7

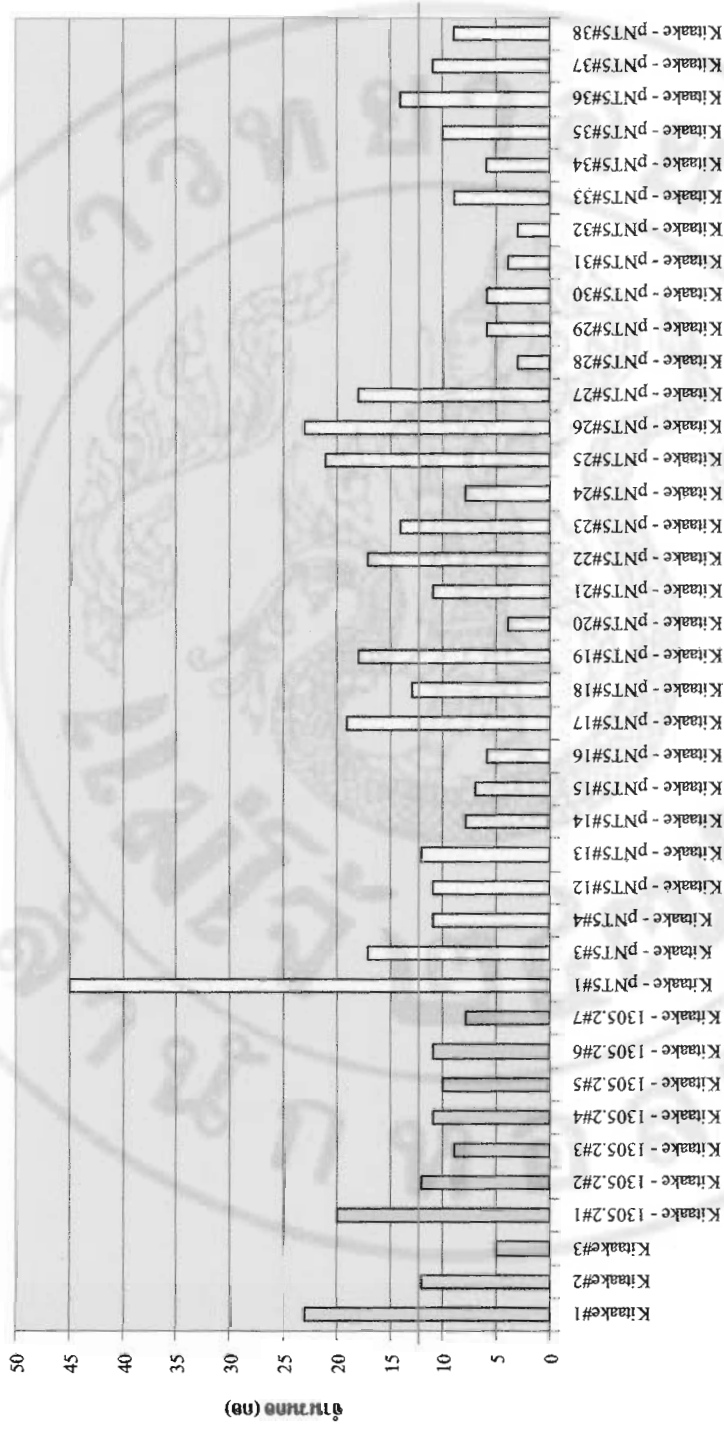
Kitaake - pNT5 #1 - 38

คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38



**หมายเหตุ:** Kitaake#1 - 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้อาซึน ต้นที่ 1 - 3 (เส้นสีแดง คือ ความสูงของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)  
 Kitaake - 1305.2#1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7  
 Kitaake - pNTS#1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 - 38

**ภาพ 58** การเปรียบเทียบความสูงของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ

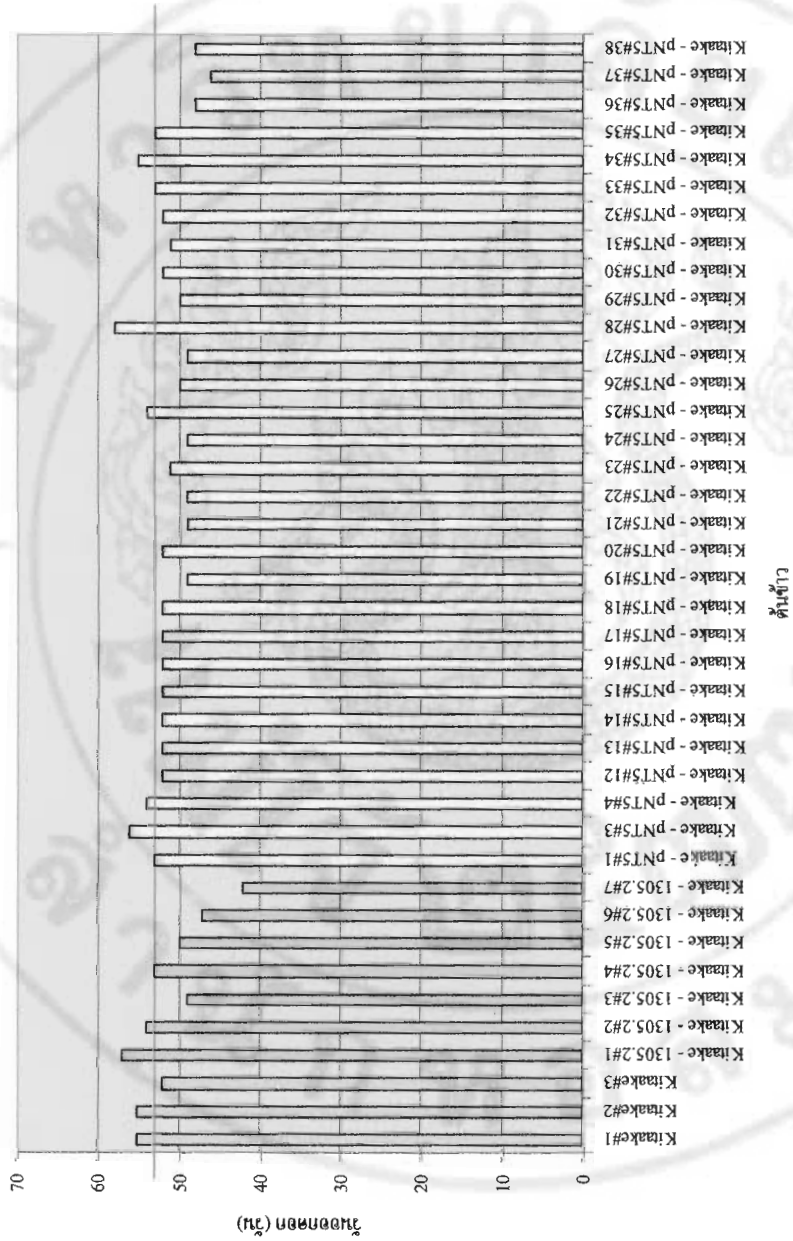


ต้นข้าว

หมายเหตุ: Kitaake#1 – 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้อายัน ต้นที่ 1 – 3 (เส้นสีแดง คือ จำนวนของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)  
 Kitaake – 1305.2 #1 – 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่อายันด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 – 7  
 Kitaake – pNTS #1 – 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่อายันด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 – 38

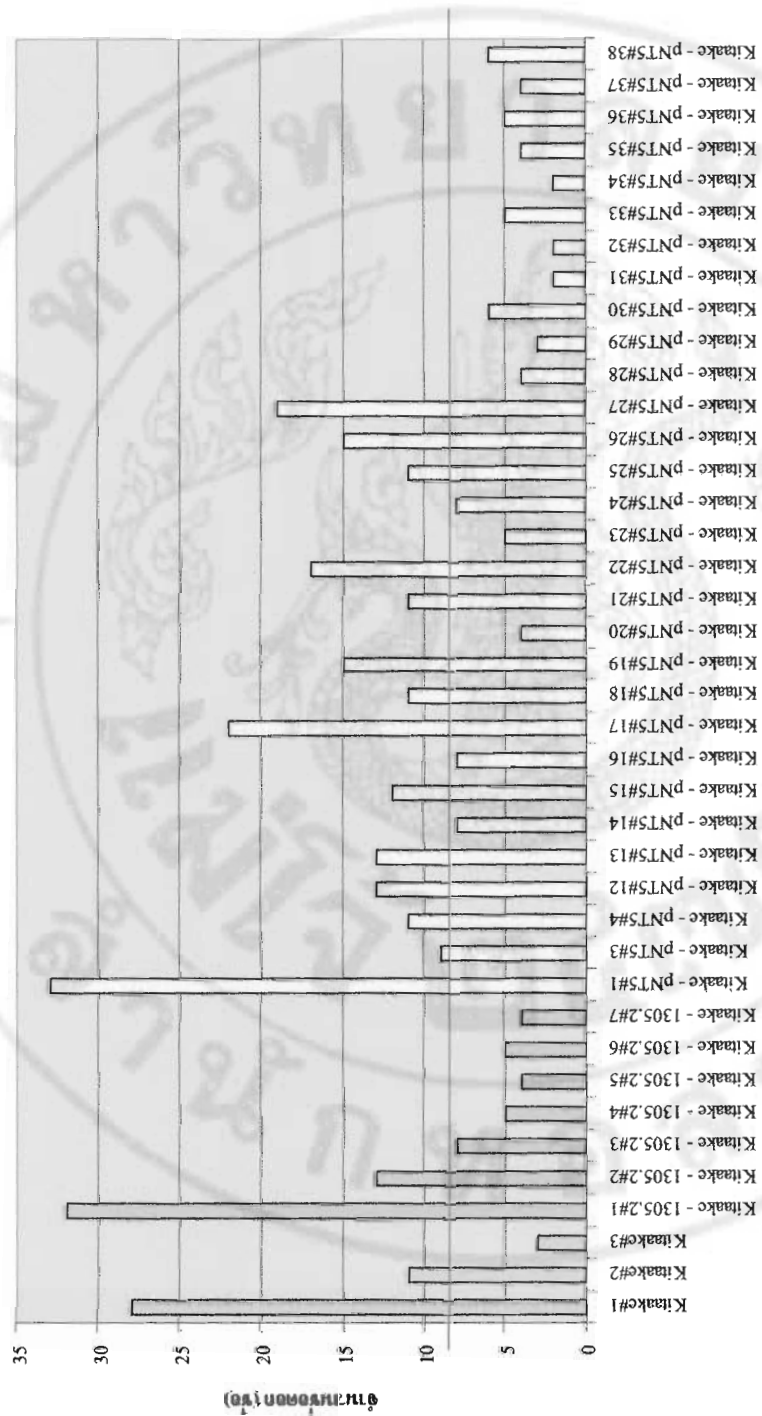
ภาพ 59 การเปรียบเทียบจำนวนของต้นข้าวที่เปลี่ยนแปลงพันธุ์รวมกับข้าวปกติ





หมายเหตุ: Kitaake#1 – 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้อยู่น ต้นที่ 1 – 3 (เส้นสีแดง คือ วันออกดอกของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)  
 Kitaake – 1305.2 #1 – 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 – 7  
 Kitaake – pNTS #1 – 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 – 38

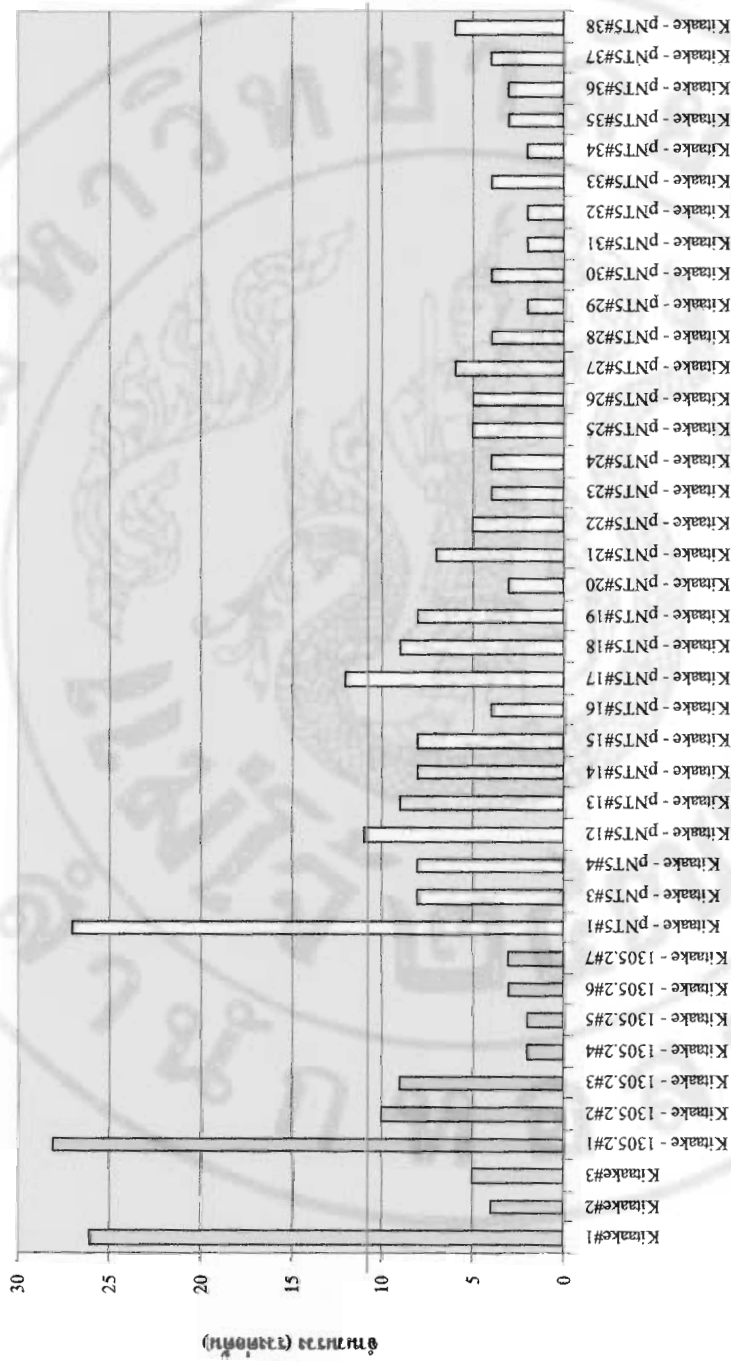
ภาพที่ 60 การเปรียบเทียบวันออกดอกของต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์รวมกับข้าวปกติ



ต้นข้าว

หมายเหตุ: Kitaake#1 – 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้อายืน ต้นที่ 1 – 3 (เส้นสีแดง) คือ จำนวนช่อดอกของต้นข้าวปกติเฉลี่ย  
 Kitaake – 1305.2 #1 – 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่อายืนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 – 7  
 Kitaake – pNTS #1 – 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่อายืนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 – 38

ภาพ 6I การเปรียบเทียบจำนวนช่อดอกของต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ



ต้นข้าว

หมายเหตุ: KiiAake#1 - 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ KiiAake ที่ไม่ได้อยู่ใน ต้นที่ 1 - 3 (เส้นสีแดง คือ จำนวนรางวัลของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)  
 KiiAake - 1305.2 #1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ KiiAake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7  
 KiiAake - pNTS #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ KiiAake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 62 การเปรียบเทียบจำนวนของต้นข้าวคัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ

ตาราง 12 การเปรียบเทียบผลผลิตและปริมาณโปรตีนของข้าว Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มขึ้น	จำนวนเมล็ด (เมล็ดต่อรวง)	น้ำหนักเมล็ด (มิลลิกรัมต่อ เมล็ด)	ปริมาณโปรตีนในเมล็ดทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกร้าน้ำหนักเมล็ด)	ร้อยละของ โปรตีนในเมล็ด
Kitaake#1	-	-	22.2	33.0	2.16 <sup>cdef</sup>	0.22 <sup>cde</sup>
Kitaake#2	-	-	18.3	32.0	2.37 <sup>bc</sup>	0.24 <sup>bc</sup>
Kitaake#3	-	-	31.0	33.0	1.67 <sup>mno</sup>	0.17 <sup>kl</sup>
Kitaake - 1305.2#1	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	14.4	37.0	2.14 <sup>cdefgh</sup>	0.21 <sup>cde</sup>
Kitaake - 1305.2#2	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	12.7	34.0	2.08 <sup>defghi</sup>	0.21 <sup>defg</sup>
Kitaake - 1305.2#3	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	14.6	36.0	2.00 <sup>ghijkl</sup>	0.20 <sup>defghi</sup>
Kitaake - 1305.2#4	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	22.5	40.0	1.75 <sup>lmno</sup>	0.17 <sup>hijkl</sup>
Kitaake - 1305.2#5	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	14.0	36.0	1.78 <sup>klmn</sup>	0.18 <sup>ghijk</sup>
Kitaake - 1305.2#6	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	24.3	33.0	0.91 <sup>s</sup>	0.09 <sup>o</sup>
Kitaake - 1305.2#7	pCAMBIA 1305.2	<i>hptII, gusA</i>	18.7	35.0	2.15 <sup>cdefgh</sup>	0.22 <sup>cde</sup>
Kitaake - pNT5#1	pNT5	<i>hptII, gusA, nrijp2</i>	17.4	41.0	1.91 <sup>ijklm</sup>	0.19 <sup>defghi</sup>
Kitaake - pNT5#3	pNT5	<i>hptII, gusA, nrijp2</i>	13.8	33.0	2.22 <sup>cdef</sup>	0.22 <sup>cde</sup>
Kitaake - pNT5#4	pNT5	<i>hptII, gusA, nrijp2</i>	26.9	43.0	1.61 <sup>no</sup>	0.16 <sup>kl</sup>
Kitaake - pNT5#12	pNT5	<i>hptII, gusA, nrijp2</i>	26.6	38.0	1.94 <sup>ghijkl</sup>	0.19 <sup>defghi</sup>

ตาราง 12 (ต่อ)

ต้นข้าว	พลาสมิด	ยีนที่เพิ่มเข้า	จำนวนเมล็ด (เมล็ดต่อรวง)	น้ำหนักเมล็ด (เมล็ดกรัมต่อ เมล็ด)	ปริมาณโปรตีนในเมล็ดทั้งหมด (เมล็ดกรัมต่อกรัมน้ำหนักเมล็ด)	ร้อยละของ โปรตีนในเมล็ด
Kitaake - pNT5#13	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	29.8	39.0	2.47 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>
Kitaake - pNT5#14	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	29.0	39.0	2.06 <sup>dehij</sup>	0.21 <sup>dehg</sup>
Kitaake - pNT5#15	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	16.6	33.0	1.52 <sup>op</sup>	0.15 <sup>lm</sup>
Kitaake - pNT5#16	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	28.5	38.0	1.10 <sup>qrs</sup>	0.11 <sup>no</sup>
Kitaake - pNT5#17	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	18.0	34.0	1.16 <sup>qr</sup>	0.12 <sup>n</sup>
Kitaake - pNT5#18	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	29.0	32.0	1.71 <sup>lmno</sup>	0.17 <sup>ijkl</sup>
Kitaake - pNT5#19	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	15.9	30.0	1.13 <sup>qrs</sup>	0.11 <sup>no</sup>
Kitaake - pNT5#20	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	20.3	29.0	2.13 <sup>cdehghi</sup>	0.21 <sup>cdef</sup>
Kitaake - pNT5#21	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	18.1	31.0	1.74 <sup>lmno</sup>	0.17 <sup>ijkl</sup>
Kitaake - pNT5#22	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	29.0	33.0	1.92 <sup>hijkl</sup>	0.19 <sup>cdeghi</sup>
Kitaake - pNT5#23	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	24.5	35.0	2.08 <sup>dehghi</sup>	0.21 <sup>dehg</sup>
Kitaake - pNT5#24	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	19.8	33.0	2.18 <sup>cdef</sup>	0.22 <sup>cde</sup>
Kitaake - pNT5#25	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	29.0	36.0	2.18 <sup>cdef</sup>	0.22 <sup>cde</sup>
Kitaake - pNT5#26	pNT5	<i>hptII, gusA, mrrjp2</i>	12.6	29.0	2.17 <sup>cdef</sup>	0.22 <sup>cde</sup>

ตาราง 12 (ต่อ)

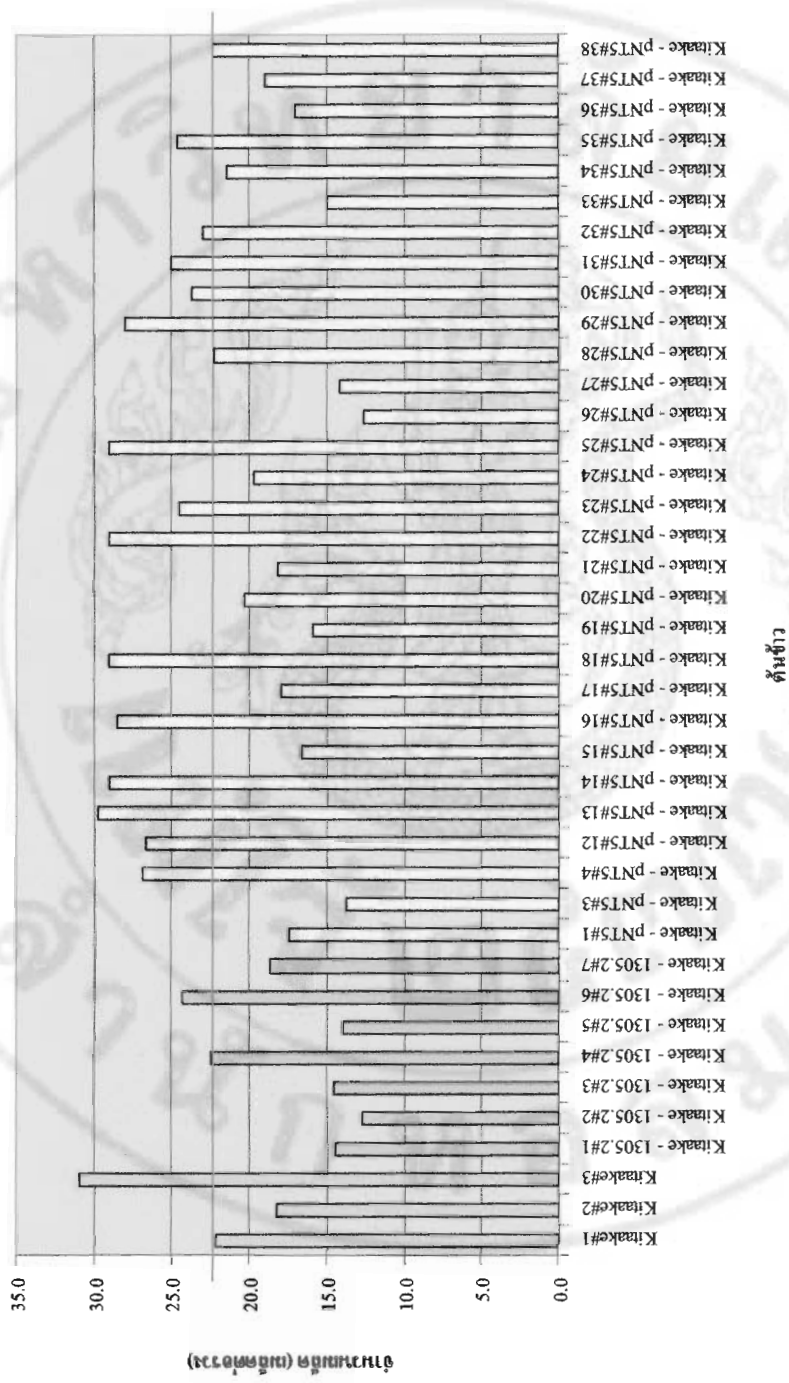
ต้นข้าว	พลาสติก	ยีนที่เพิ่มขึ้น	จำนวนเมล็ด (เมล็ดต่อรวง)	น้ำหนักเมล็ด (เมล็ดกรัมต่อเมล็ด)	ปริมาณโปรตีนในเมล็ดทั้งหมด (เมล็ดกรัมต่อกรัมน้ำหนักเมล็ด)	ร้อยละของ โปรตีนในเมล็ด
Kitaake - pNT5#27	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	14.2	31.0	2.53 <sup>b</sup>	0.25 <sup>ab</sup>
Kitaake - pNT5#28	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	22.3	33.0	2.78 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>
Kitaake - pNT5#29	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	28.0	30.0	2.16 <sup>cdefg</sup>	0.22 <sup>cde</sup>
Kitaake - pNT5#30	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	23.8	33.0	1.90 <sup>klm</sup>	0.19 <sup>ghij</sup>
Kitaake - pNT5#31	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	25.0	36.0	2.15 <sup>cdeigh</sup>	0.21 <sup>cde</sup>
Kitaake - pNT5#32	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	23.0	34.0	2.30 <sup>bcd</sup>	0.23 <sup>bcd</sup>
Kitaake - pNT5#33	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	15.0	30.0	2.06 <sup>ghij</sup>	0.21 <sup>efgh</sup>
Kitaake - pNT5#34	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	21.5	30.0	1.77 <sup>klmn</sup>	0.18 <sup>ghijkl</sup>
Kitaake - pNT5#35	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	24.7	29.0	1.75 <sup>lmno</sup>	0.18 <sup>hijkl</sup>
Kitaake - pNT5#36	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	17.0	33.0	1.73 <sup>lmno</sup>	0.17 <sup>ijkl</sup>
Kitaake - pNT5#37	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	19.0	35.0	1.31 <sup>pq</sup>	0.13 <sup>mn</sup>
Kitaake - pNT5#38	pNT5	<i>hptII, gusA, mirjp2</i>	22.3	33.0	1.05 <sup>s</sup>	0.11 <sup>no</sup>

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Least Significant Difference

Kitaake#1 - 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้อายีน ต้นที่ 1 - 3 (เส้นสีแดง) คือ ปริมาณโปรตีนในเมล็ดของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)

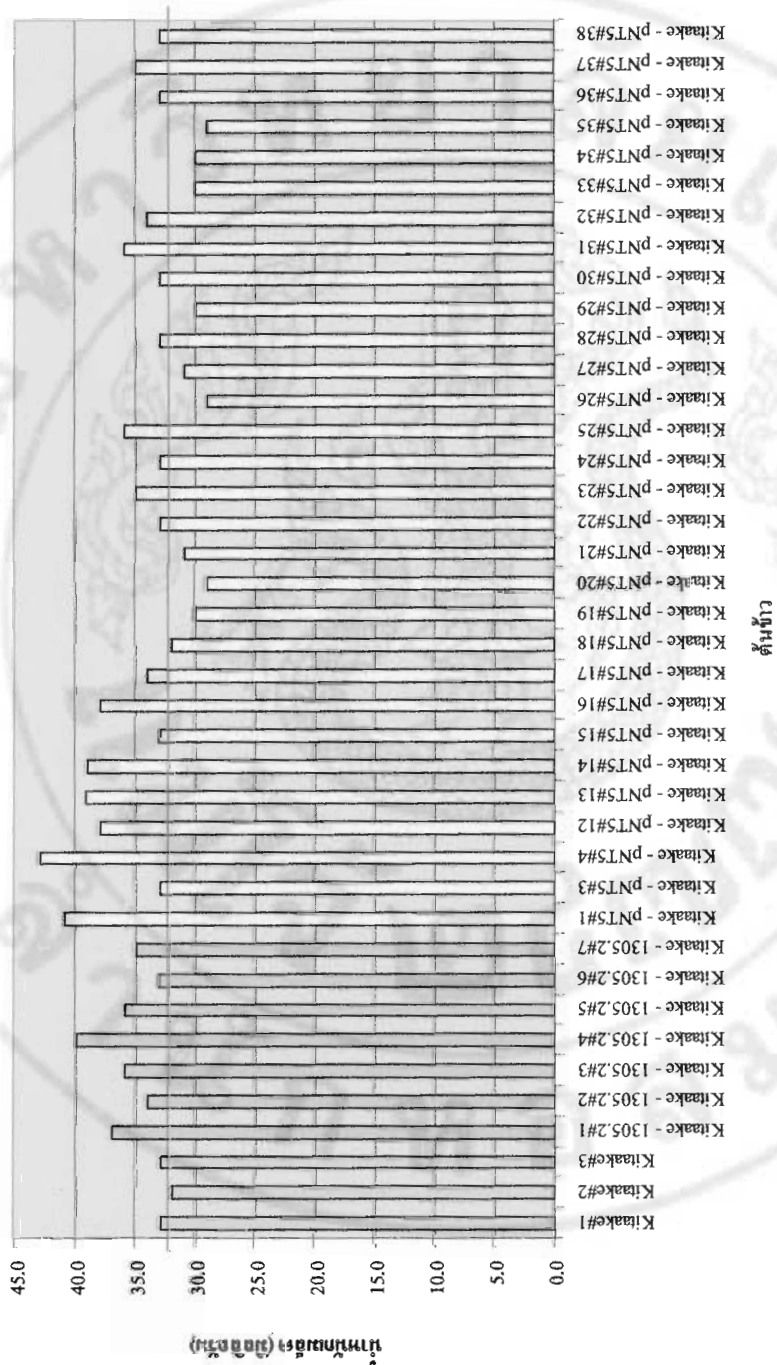
Kitaake - 1305.2#1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7

Kitaake - pNT5#1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38



หมายเหตุ: Kitaake#1-3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ต้นที่ 1-3 (เส้นสีแดง คือ จำนวนเมล็ดของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)  
 Kitaake-1305.2#1-7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1-7  
 Kitaake-pNTS#1-38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1-38

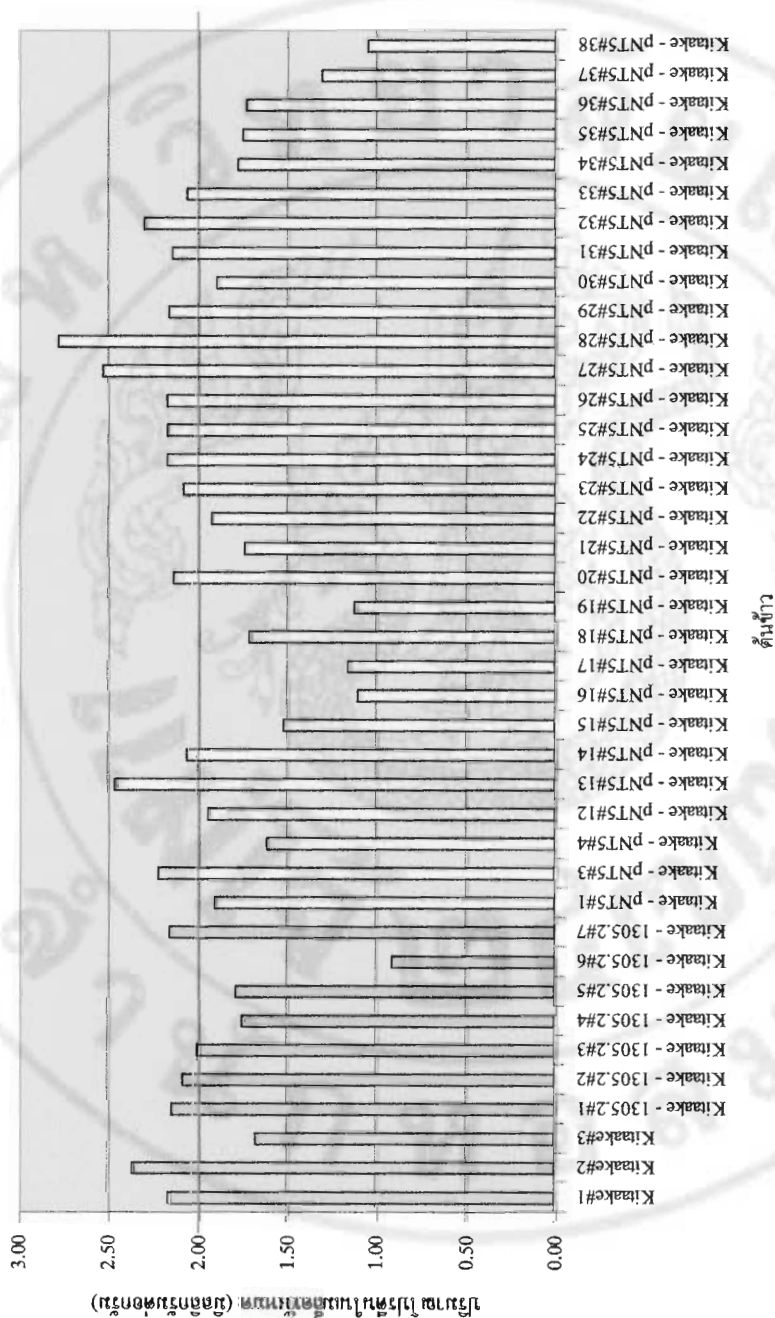
ภาพ 63 การเปรียบเทียบจำนวนเมล็ดของต้นข้าวตั้งแต่แปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ



หมายเหตุ: Kitaake#1 - 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ต้นที่ 1 - 3 (เส้นสีแดง) คือ นำหนักรวมเมล็ดของต้นข้าวปกติเฉลี่ย  
 Kitaake = 1305.2 #1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7  
 Kitaake - pNTS #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 64 การเปรียบเทียบนำหนักรวมเมล็ดของต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมกับข้าวปกติ





หมายเหตุ: Kitaake#1 – 3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ถ่ายยีน ต้นที่ 1 – 3 (เส้นสีแดง คือ ปริมาณโปรตีนในเมล็ดของต้นข้าวปกติเฉลี่ย)  
 Kitaake – 1305.2 #1 – 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 – 7  
 Kitaake – pNTS #1 – 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNTS ต้นที่ 1 – 38

ภาพ 65 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในเมล็ดของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมกับข้าวปกติ

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการทดลอง

1. จากการทดลองสามารถสร้างพลาสมิดเวกเตอร์ pNT5 ขนาด 14,633 คู่เบส สำหรับใช้ถ่ายยีนในข้าว โดยพลาสมิด pNT5 ประกอบด้วยชุดยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ซึ่งควบคุมการทำงานโดย 35S dual enhancer promoter, TEV leader และ 35S terminator (E35S::TEV leader::*mrjp2*::T35S) แทรกอยู่บริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ของพลาสมิด pCAMBIA1305.2 มียีนคัดเลือก และรายงานผล คือ ยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และยีนสร้างเอนไซม์  $\beta$  - glucuronidase ตามลำดับ

2. ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ดัดแปลง ซึ่งมีฮอร์โมน 2, 4 - D เข้มข้น 4 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และที่มืด ตามลำดับ โดยแคลลัสของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดต้นข้าวที่สมบูรณ์ด้วยอาหารสูตร MS ดัดแปลง ซึ่งมีฮอร์โมน NAA และไคเนติน เข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. การศึกษาการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 พบว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ แต่แคลลัสที่ได้รับยีนไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้

4. การศึกษาการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake พบว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ได้ โดยแคลลัสที่ได้รับยีนสามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ จำนวน 30 ต้น โดยต้นข้าวจำนวน 13 ต้น (คิดเป็นร้อยละ 43.33) ซึ่งมียีนโปรตีนนมผึ้งแทรกอยู่ในจีโนม มีการแสดงออกในระดับ mRNA จำนวน 11 ต้น (คิดเป็นร้อยละ 36.67) แต่ไม่สามารถตรวจการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ได้

5. การศึกษาการเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T<sub>0</sub> พบว่า ความสูง จำนวนวันออกดอก จำนวนกอ จำนวนรวง และจำนวนเมล็ด ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ไม่มีความแตกต่างกับข้าวปกติ แต่พบว่า ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูงกว่าข้าวปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

6. งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกซึ่งประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน *mrjp2* จากผึ้งเข้าสู่ข้าว และเกิดการแสดงออกได้ในข้าวซึ่งจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

#### ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในระดับโปรตีน ควรมีการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนนมผึ้ง เนื่องจากจะทำให้สามารถตรวจสอบโปรตีนได้โดยตรง และมีความแม่นยำกว่าการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine (6xHis – tag)
2. หลังการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีผลต่อการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัส ทำให้ไม่สามารถได้ต้นข้าวพันธุ์ กข 6 คัดแปลงพันธุกรรม ดังนั้นควรมีการพัฒนากระบวนการถ่ายยีนในยอดอ่อนของข้าว เพื่อใช้ในการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เนื่องจากหลังการถ่ายยีน แคลลัสที่เจริญได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

## เอกสารอ้างอิง

- กษิทธิฐ ดิษฐบรรจง. 2544. การสร้างสิ่งมีชีวิต (พืช) ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม. น. 56 – 60. กรมวิชาการเกษตร. ใน. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิค กรมวิชาการเกษตร.
- กิตติกร พงษ์พานิช. 2546. การเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวและการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 68 น.
- เกษณี มณีภาส. 2546. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยการใช้ **mini – binary vector**. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.
- เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, สุนันทิพย์ บุญนาค, ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์, มานิตย์ โฆษิตตระกุล และอนวัช สุวรรณกุล. 2548. การส่งถ่ายยีนโคทิเนสเข้าสู่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. น. 375 - 381. ใน. เอกสารการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14 สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.
- ขวัญเดือน รัตนา. 2544. การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นใหม่และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว (*Oryza sativa* L.). ขอนแก่น: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 101 น.
- จันทร์ประภา อิมจใจรัถย์. 2543. การทรานส์ฟอร์มรีพอร์เตอร์ยีนที่สร้างโปรตีนกรีนฟลูออเรสเซนส์เข้าสู่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* cv. KDML 105 โดยเลี้ยงร่วมกับอโกรแบคทีเรีย. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 117 น.
- จรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 230 น.
- จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ นัยวิกุล. 2546. รัชชาติและผลิตภัณฑ์. น. 400 – 414. ใน. คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์, กิตติกร พงษ์พานิช, บุรณศักดิ์ เชื้อทอง และนลินี รุ่งเรืองศรี. 2547. การเพาะเลี้ยงแคลลัสและการถ่ายยีนของข้าวเหนียวไทย. น. 286 – 293. ใน รายงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 5. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ฉิมมน ธรรมรักษ์. 2547. การเพาะเลี้ยงแคลลัสและการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 86 น.

- น้ำทิพย์ พิรณฤทธิ. 2544. การถ่ายยีนไวรัสสาเหตุโรคข้าวให้กับข้าวไร่. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 96 น.
- นิตยศรี แสงเดือน และสัมพันธ์ สัมพันธ์รักษ์. 2548. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 266 น.
- ประภา ศรีพิจิตต์. 2532. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิจัย.) 23 : 324 - 330.
- ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิจัย.) .28 : 27 - 37.
- พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2537. ความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 176 น.
- พิชญภา มหาสุข. 2547. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนในข้าวเหนียวไทย และการวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 78 น.
- พิเชียร คุระทอง. 2546. ผ่าพืชแปลงพันธุ์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน. 232 น.
- มรกต ต้นติเจริญ และ ศิริพร เลิศจำรัสสถกษณ์. ม.ป.ป. เทคโนโลยีชีวภาพกับการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว. กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- ลัดดาวัลย์ เต็มแก้ว. 2548. การศึกษาการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และการวิเคราะห์ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 76 น.
- ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์นุกุล, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, พัฒนา ศรีฟ้า และอมราทองปาน. 2543. การแสดงออกของยีน Chymotrypsin inhibitor ของถั่วพูในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105. น.252 - 256. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่ง ครั้งที่ 11. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวต่างประเทศ. 2551. ผลผลิตข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.riceexporters.or.th/production.htm> (12 พฤษภาคม 2551).
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2547. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook47/Section1/sec1table1.pdf> (18 มีนาคม 2549).

- สุพรรณฉวีภา เสียงสาย และประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอม 3 พันธุ์. น. 337 – 342. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.
- สุรางค์ศรี วาเพชร. 2537. การถ่ายทอดลักษณะพันธุ์เบา ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตจากการผสมพันธุ์ข้าวระหว่างจาโปนิก้า และอินดิก้า. เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 87 น.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 น.
- อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิศย์ศรี แสงเดือน. 2544. การถ่ายยีนในไมโครแคลล์สของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60. น.150 - 154. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 12. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2543. การย้ายและการแสดงออกของยีนในข้าวสายพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 โดยอโครแบคทีเรียม. น.210 – 214. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 11. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2540. ข้าว: พืชต้นแบบทางวิทยาศาสตร์. น.33 - 35. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 336 น.
- อัมมาร สยามวาลา และวิโรจน์ สยามวาลา. 2533. ประมวลความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย. 436 น.
- อารีย์ วรรณัญญวัฒน์. 2542. การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ. น. 157 – 164. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- Ahmad, A., S. B. Maqbool, S. Riazuddin and M. B. Sticklen. 2002. Expression of synthetic *cryIAB* and *cryIAC* genes in basmati rice (*Oryza sativa* L.) variety 370 via agrobacterium – mediated transformation for the control of European corn borer (*Ostrina nubilalis*). *In Vitro Cell Developed Biology – Plant* 38: 213 – 220.
- Albert, S. and J. Kludiny. 2004. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology* 50: 51 – 59.

- Albert, S., J. Klaudiny and J. Šimúth. 1999. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Insect Biochemical and Molecular Biology** 29: 427 - 434.
- Altpeter, F., V. Vasil, V. Srivastava and I. K. Vasil. 1996. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. **Nature Biotechnology** 14: 1155 – 1159.
- Andersson, I. and A. Backlund. 2008. Structure and function of rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry** 46: 275 – 291.
- Angenon, G., W. Dillen and M. Van Montagu. 1994. Antibiotic resistance markers for plant transformation. Pp. 1 – 13. In S.B. Gelvin, R. A., Schilperoort (eds.). **Plant Molecular Biology Manual**. Second edition. Dordrecht: Kluwer.
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture (CAMBIA). 2005. **GUSPlus overview**. [online]. Available <http://www.bioforge.net/forge/entry.jspa?externalID=41&categoryID=3> (15 May 2005).
- Chan, M.T., H.H. Chang, S. L.Ho, W.F. Tong and S.M. Yu. 1993. *Agrobacterium* - mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric  $\alpha$  - amylase promoter/  $\beta$  - glucuronidase gene. **Plant Molecular Biology** 22: 491 – 509.
- Cheng, M., J.E. Fry, S.Z. Pang, H. P. Zon, C. M. Hironaka, D. R. Duncan, T. W. Conner and Y. C. Yang. 1998. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology** 115: 971 – 980.
- Cho, H. J., K. P. Choi, M. Yamashita, H. Morikawa and Y. Murooka. 1995. Introduction and expression of the *Streptomyces* cholesterol oxidase gene (*ChoA*), a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae, into tobacco cells. **Applied Microbial Biotechnology** 44(1 - 2): 133 - 138.
- Christou, P. 1997. Rice transformation: bombardment, p. 197 – 203. In T. Sasaki and Moore (eds.). **Oryza: From Molecule to Plant**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. pp. 43 - 50. **In. Proceeding Symposium on Plant Tissue Culture.** Beijing: Science Press.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin and C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture in rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Science Sinica.** 18 : 659 – 668.
- Chyi, Y. and G.C. Phillips. 1987. High efficiency *Agrobacterium* – mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. **Plant Cell Reports** 6: 105 – 108.
- Czapla, T.H. and B.A. Lang. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: *Pyralidae*) and southern corn rootworm (Coleoptera: *Chrysomelidae*). **Journal of Economic Entomology** 83(6): 2480 – 2485.
- Du, G., C. Song, G. Zhang, X. Sun and D. Liu. 2005. Transgenic *Lycium barbarum* L. established as HIV capsid protein expression system. **Plant Molecular Biology Reports** 23: 411 – 416.
- Falco, S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward and P. Webber. 1995. Transgenic Canola and Soybean Seeds with Increased Lysine. **Bio/Technology.** 13: 577 – 582.
- Firoozabady, E. and K. R. Adelheid. 1996. *Agrobacterium* – mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 358: 181 – 195.
- Hamid, R., S. Yokoi, K. Toriyama and K. Himta. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice. **Plant Cell Reports** 15: 727 – 730.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari 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 Journal.** 6: 271 – 282.
- Hilder, V.A., A.M.R. Gatehouse, S.E. Sheerman, R.F. Barker and D. Boulter. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature** 330: 160 - 163.
- Hood, E.E., Hemer, G.L., Fraley, R.T., Chilton, M-D. 1986. The hyper virulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T – DNA. **Journal of Bacteriology** 168: 1291 – 1301.



- Hooykaas, P.J. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* : a natural vector system. pp. 3 - 4. In I. Potrykus and G. Spangenberg (ends.). **Gene Transfer to Plants**. Berlin: Springer – Verlag.
- Howe, S.R., P.S. Dirnack and A.W. Benton. 1985. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. **Journal of Agricultural Research** 24: 52 – 61.
- Huang, J., X. Ge and M. Sun. 2000. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. **Biotechniques** 28(3): 432 – 434.
- Huang, N. 2004. High - level protein expression system uses self - pollinating crops as hosts. **BioProcess International** 4: 54 – 59.
- Hughes, M.A. 1996. **Plant Molecular Genetic**. Dorset, England: Longman Dorchester. 236 p.
- Ikisan. 2005. **Rice morphology**. [Online]. Available on [http://www.ikisan.com/links/ap\\_ricemorp.shtml](http://www.ikisan.com/links/ap_ricemorp.shtml) (15 May 2005).
- Imjongjirak, C., S. Klinbunga and S. Sittipraneed. 2005. Cloning, Expression and Genomic Organization of Genes Encoding Major Royal Jelly Protein 1 and 2 of the Honey Bee (*Apis cerana*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 38(1): 49 – 57.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reports** 5: 387 – 405.
- Júdová, J., R. Šutka, J. Klaudivy, D. Liškova, D. W. Ow and J. Šimuth. 2004. Transformation of tobacco plants with cDNA encoding honeybee royal jelly MRJP1. **Biologia Plantarum** 48(2): 185 – 191.
- Kahl, g., K. Oba , M Furuta and L. Uritani. 1982. Wounding - induced enhancement of the activity of chromatin and DNA - dependent RNA polymerases in sweet potato root. **Agricultural and Biological Chemistry** 46: 2457 – 2463.
- Karavangeli, M., N. E. Labrou, Y. D. Clonis and A. Tsiftaris. 2005. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S – transferase I for chloroacetanilide herbicide phytoremediation. **Biomolecular Engineering** 22: 121 – 128.
- Kasuga M., S. Miura, K. Shinozaki and K. Yamaguchi - Shinozaki. 2004. A combination of the arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology** 45(3): 346 – 350.

- Klaudiny, J., J. Hanes, J. Kulifajova, S. Albert and J. Simuth. 1994. Molecular cloning of two cDNA from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly. **Journal of Apicultural Research** 33: 105 – 111.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and T. Kumashiro. 1996. Vector carrying two separate T – DNA of co – transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **The Plant Journal** 10: 165 – 174.
- Linda, M. A. and M. Morris. 1994. Transient expression assay using GUS construct and fluorometric detection for analysis of T – DNA transfer. **Plant Molecular Biology Manual** B5: 1 – 16.
- Liu, J., C. Hara, M. Umeda, Y. Zhao, T. W. Okita and H. Uchimiya. 1995. Analysis of randomly isolated cDNAs from developing endosperm of rice (*Oryza sativa* L.): evaluation of expressed sequence tags, and expression levels of mRNAs. **Plant Molecular Biology** 29: 685 - 689.
- Liu, M., J. Zhu, Z. Sun and T. Xu. 2007. Possible suppression of exogenous  $\beta$  - 1, 3 - glucanase gene gluc78 on rice transformation and growth. **Plant Science** 172: 888 – 889.
- Logemann, J., G. Jach, H. Tommerup, J. Mundy and J. Schell. 1992. Expression of a barley ribosome - inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. **Bio/Technology** 10: 305 – 308.
- Malecová, B., J. Ramser, J. K. O'Brien, M. Janitz, J. Júdová, H. Lehrach and J. Šimúth. 2003. Honeybee (*Apis mellifera* L.) *mrjp* gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of *mrjp1*, the gene coding for the most abundant protein of larval food. **Gene**. 303: 165 – 175.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology** 15: 431 - 497.
- Nishizawa, Y., Z. Nishio, K. Nakazono, M. Soma, E. Nakajima, M. Ugaki and T. Hibi. 1999. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic *Japonica* rice by constitutive expression of rice chitinase. **Theoretical and Applied Genetics** 99: 3 – 4.

- Nguyen Tuan Anh. 2002. **An improved reporter system based on a novel  $\beta$  - glucuronidase (GUS) from *Staphylococcus sp.*** Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Australian National University. 135 p.
- Ofoghi, H., N. Moazami and I. Ivanon. 2005. Comparison of Tobacco Etch Virus and Tobacco Mosaic Virus enhancers for expression of human calcitonin gene in transgenic potato plant. **Key Engineering Materials** 227 – 279: 7 – 11.
- Okamoto, I., Y. Taniguchi, T. Kunikata, K. Kohno, K. Iwaki, M. Ikeda and M. Kurimoto . 2003. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. **Life Sciences**. 73(16): 2029 – 2045.
- Pipatpanukul, T., S. Bunnag, P. Theerakulpisut and M. Kosittrakul. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD 6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Songklanakalin Journal of Science and Technology** 26(1): 1 - 13.
- Poeaim, A., N. Sangduen, W. Kaewunsong, W. Boonmae and S. Pongchareankit. 1995. Growth curve of Kao – Dawk – Mali 105 rice (*Oryza sativa* L.) suspension culture, pp. 204 **In International Conference on Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development**. Bangkok: Chulabhorn Research Institute. (Poster).
- Raina, S. K., P. Sathish and K. S. Shormma. 1987. Plant regeneration from in vitro culture of anther and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Basmati 370. **Plant Cell Reports** 6: 43 – 45.
- Ramesh, S., D. Nagadhara, V.D. Reddy and K.V. Rao. 2004. Production of transgenic *indica* rice resistant to yellow stem borer and sap – sucking insects, using super – binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science** 166: 1077 – 1085.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama and K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice. **Plant Cell Reports** 15: 727 – 730.
- Roy, M. and R. Wu. 2001. Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. **Plant Science** 160: 1077 – 1085.
- Saharan V., C.R. Yadav, R.N. Yadav and P.B. Chapagain. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica* rice (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology** 3(5): 256 – 259.
- Sambrook, J., P. MacCallum and D. Russell. 2000. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Third Edition. New York: CSHL Press. 2385 p.

- Schmitzova, J., J. Kloudiny, S. Albert, W. Schroder, W. Schreckengost, J. Hanes, J. Judova and J. Simuth. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. Cellular and Molecular. **Life Sciences** 54: 1020 – 1030.
- Shimamoto K. 1995 . The Molecular Biology of Rice. **Science** 270: 1772 - 1773.
- Sindhu, A. S., Z. Zheng and N. Murai. 1997. The pea seed storage protein legumin was synthesized, processed and accumulated stably in transgenic rice endosperm. **Plant Science** 130: 189 – 196.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science** 35: 301 - 309.
- Toki, S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium* – mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology**. 15 (1): 16-21.
- Tomilov, A., N. Tomilova and J. I. Yoder. 2007. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence. **Planta** 225: 1059 – 1071.
- Truve, E., M. Kelve, A. Aaspõllu, A. Kuusksalu, P. Seppänen and M. Saarma. 1994. Principles and background for the construction of transgenic plants displaying multiple virus resistance. **Archives of virology Supplementum** 9: 41 - 50.
- Vajrabhaya, M., O. Tunmvachkul and T. Vajrabhaya. 1986. Effect of auxin and cytokinin on plant regeneration from rice callus. **Journal of Science Research Chulalongkorn University** 11: 113 – 115.
- Van Larebeke, N., G. Engler., M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaennen, R. A. Schilperoort and *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall – inducing ability. **Nature**. 252: 9 – 170.
- Vasil, I.K. 1994. Cellular and molecular genetic improved of cereal, pp.5-19. In M. Terzi, R. Cella and A. Falauigna (eds.). **Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology**. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Vasil, I. K. 1996. Molecular improvement of cereal. **Plant Molecular Biology** 25: 925 – 937.
- Wang, F., Q. Wang, S. Kwon, S. Kwak and W. Su. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. **Journal of Plant Physiology** 162: 465 – 472.

- Wang, Z. and Y. Ge. 2005. *Agrobacterium* - mediated high efficiency transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea*). **Journal of Plant Physiology** 162: 103 – 113.
- Webster R. K. and P. S. Gunnell. 1992. **Compendium of Rice Diseases**. England: APS Press. 236 p.
- Wen, T. and D. S. Luthe. 1985. Biochemical characterization of rice glutelin. **Plant Physiology** 78: 172 - 177.
- Wu, C., T. Adachi, T. Hatano, H. Washida, A. Suzuki and F. Takaiwa. 1998. Promoters of rice seed storage protein genes direct endosperm - specific gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology** 39(8): 885 – 889.
- Wu, L. and H.W. Li. 1970. Introduction of callus tissues initiation from different somatic organs of plant by various concentration of 2, 4 - dichlorophenoxy acetic acid. **Cytologia** 36: 411 – 416.
- Yamagata H., T. Sugimoto, K. Tanaka and Z. Kasai. 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. **Plant Physiology** 70: 1094 - 1100.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

#### 1. อาหารสูตร LB (Luria – Bertani medium)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

หมายเหตุ หากต้องการทำให้เป็นอาหารแข็งให้เติม Bacto – Agar 15 กรัม

### อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

#### 1. อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ประกอบด้วย

##### 1.1. ธาตุอาหารหลัก ประกอบด้วย

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{KNO}_3$	1,900	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	มิลลิกรัมต่อลิตร

##### 1.2. ธาตุอาหารรอง ประกอบด้วย

KI	0.83	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร



$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	37.3	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{EDTA}^*$	27.8	มิลลิกรัมต่อลิตร

### 1.3. วิตามิน และสารอินทรีย์ ประกอบด้วย

nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
pyridoxine – Hcl	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
thiamine – HCl	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
glycine	2.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
myo – inositol	100	มิลลิกรัมต่อลิตร

#### หมายเหตุ

\* คือ สามารถใช้รวมในรูป  $\text{NaFeEDTA}$  แทนได้

## 2. อาหารสูตร N6 (Chu, 1978) ประกอบด้วย

### 2.1. ธาตุอาหารหลัก ประกอบด้วย

$\text{KNO}_3$	2,830	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	166	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	400	มิลลิกรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	463	มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2.2. ธาตุอาหารรอง ประกอบด้วย

KI	0.8	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.6	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.3	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	37.3	มิลลิกรัมต่อลิตร
$\text{Na}_2\text{EDTA}^*$	27.8	มิลลิกรัมต่อลิตร

## 2.3. วิตามิน และสารอินทรีย์ ประกอบด้วย

nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
pyridoxine – Hcl	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
thiamine – HCl	0.5	มิลลิกรัมต่อลิตร
glycine	40	มิลลิกรัมต่อลิตร

หมายเหตุ

\* คือ สามารถใช้รวมในรูป NaFeEDTA แทนได้





ภาคผนวก ข  
ผลการวิเคราะห์

## ผลการวิเคราะห์

1. ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรม

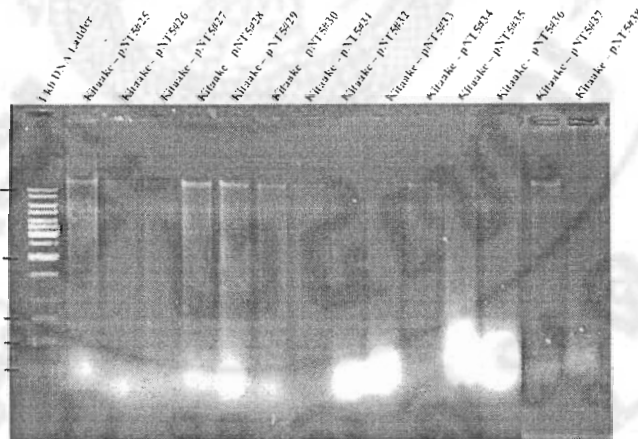
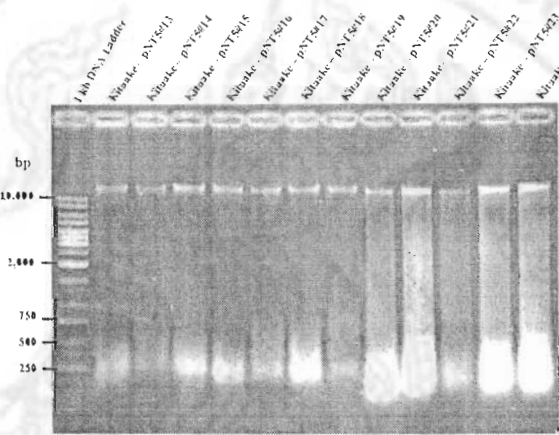
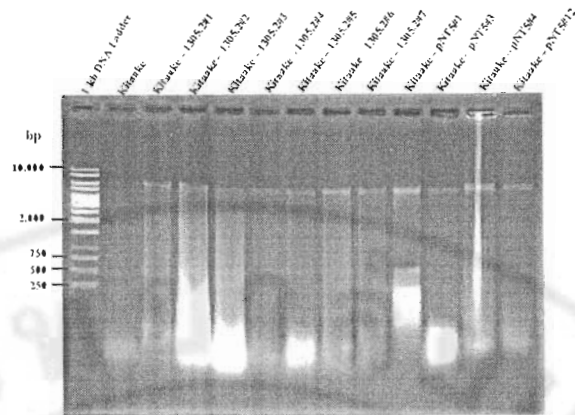
ตาราง 13 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรม

ตัวอย่าง	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	อัตราส่วน A <sub>260</sub> :A <sub>280</sub>	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
Kitaake	0.2998	0.1850	1.62	599.6
Kitaake - 1305.2#1	0.2359	0.1262	1.87	471.8
Kitaake - 1305.2#2	1.1286	0.6719	1.68	2257.2
Kitaake - 1305.2#3	1.4158	0.9485	1.49	2831.6
Kitaake - 1305.2#4	0.1303	0.0673	1.94	260.6
Kitaake - 1305.2#5	0.1980	0.1213	1.63	792.0
Kitaake - 1305.2#6	0.1387	0.0714	1.94	277.4
Kitaake - 1305.2#7	0.1027	0.0534	1.92	205.4
Kitaake - pNT5#1	0.2354	0.1235	1.91	470.8
Kitaake - pNT5#3	0.3653	0.1965	1.86	730.6
Kitaake - pNT5#4	0.2596	0.1325	1.96	519.2
Kitaake - pNT5#12	0.2935	0.1621	1.81	587.0
Kitaake - pNT5#13	0.1963	0.1156	1.70	392.6
Kitaake - pNT5#14	0.2394	0.1389	1.72	478.8
Kitaake - pNT5#15	0.2174	0.1253	1.74	434.8
Kitaake - pNT5#16	0.2379	0.1489	1.60	475.8
Kitaake - pNT5#17	0.2198	0.1289	1.71	439.6
Kitaake - pNT5#18	0.2733	0.1696	1.61	546.6
Kitaake - pNT5#19	0.3139	0.1306	2.40	627.8
Kitaake - pNT5#20	0.4093	0.2081	1.97	818.6

ตาราง 13 (ต่อ)

ตัวอย่าง	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	อัตราส่วน A <sub>260</sub> : A <sub>280</sub>	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
Kitaake - pNT5#21	0.1151	0.0594	1.94	230.2
Kitaake - pNT5#22	0.2825	0.1424	1.98	565.0
Kitaake - pNT5#23	0.4638	0.2367	1.96	927.6
Kitaake - pNT5#24	0.4910	0.2605	1.88	982.0
Kitaake - pNT5#25	0.3996	0.2273	1.76	799.2
Kitaake - pNT5#26	0.3165	0.1705	1.86	633.0
Kitaake - pNT5#27	0.4194	0.2226	1.88	838.8
Kitaake - pNT5#28	0.4503	0.2343	1.92	900.6
Kitaake - pNT5#29	0.3389	0.1808	1.87	677.8
Kitaake - pNT5#30	0.1940	0.1083	1.79	388.0
Kitaake - pNT5#31	0.2900	0.1693	1.71	1160.0
Kitaake - pNT5#32	0.6287	0.3990	1.58	2514.8
Kitaake - pNT5#33	0.2462	0.1333	1.85	492.4
Kitaake - pNT5#34	0.4954	0.2896	1.71	1981.6
Kitaake - pNT5#35	0.6262	0.3810	1.64	2504.8
Kitaake - pNT5#36	0.2516	0.5502	0.46	503.2
Kitaake - pNT5#37	0.1371	0.0787	1.74	274.2
Kitaake - pNT5#38	0.2238	0.1619	1.38	447.6

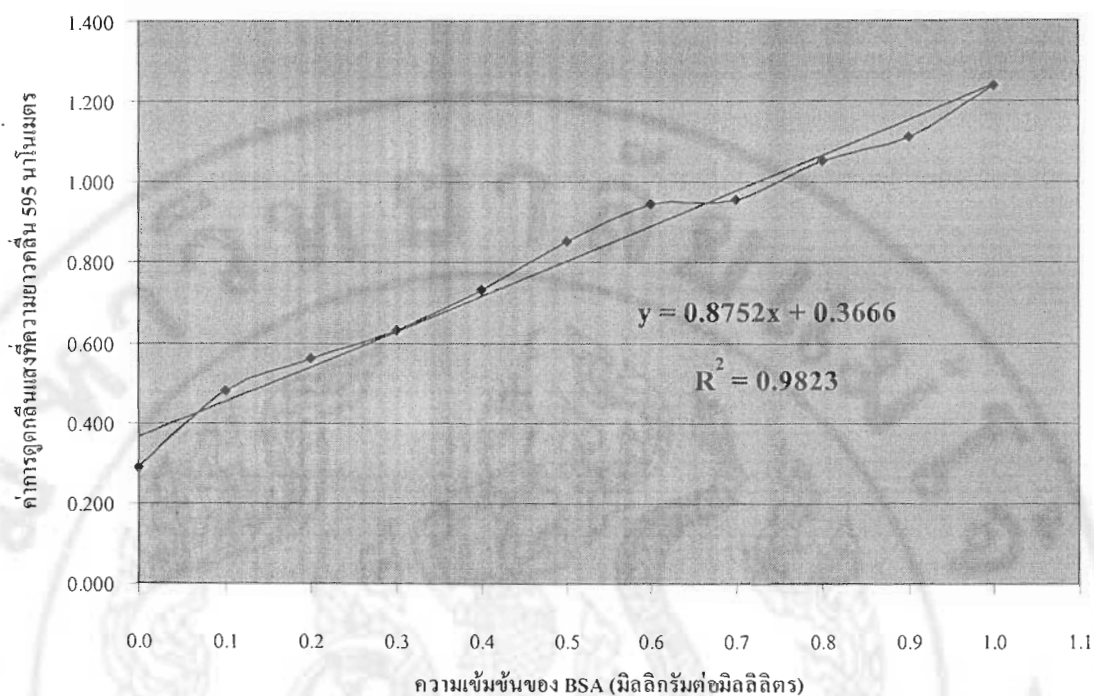
หมายเหตุ: Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน  
 Kitaake - 1305.2 #1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด  
 pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7  
 Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5  
 ต้นที่ 1 - 38



- หมายเหตุ:
- 1 kb DNA Ladder คือ DNA marker
  - Kitaake คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน
  - Kitaake - 1305.2 #1 - 7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ต้นที่ 1 - 7
  - Kitaake - pNT5 #1 - 38 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pNT5 ต้นที่ 1 - 38

ภาพ 66 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake คัดแปลงพันธุกรรม

## 2. กราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน BSA



ตาราง 14 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ( $A_{595}$ )
0.0	0.286
0.1	0.480
0.2	0.561
0.3	0.632
0.4	0.730
0.5	0.852
0.6	0.944
0.7	0.958
0.8	1.053
0.9	1.112
1.0	1.238

### การคำนวณปริมาณโปรตีน

#### 1. ความเข้มข้นโปรตีนที่สกัดได้

$$\text{ความเข้มข้นโปรตีนที่สกัดได้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{595} - 0.3666}{0.8752}$$

#### 2. ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

$$\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)} = \frac{\text{ความเข้มข้นโปรตีนที่สกัดได้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)}}{1}$$

#### 3. ร้อยละของโปรตีนในเมล็ด

$$\text{ร้อยละของโปรตีนในเมล็ด} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักเมล็ด (g)}}$$







ภาคผนวก ค  
ประวัติผู้วิจัย

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นางสาวณิชนน ธรรมรักษ์
เกิดเมื่อ	28 สิงหาคม 2526
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนคาราวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2548 วท. บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
รางวัล/ทุนวิจัย	รองชนะเลิศ อันดับ 1 การแข่งขันทักษะทางวิทยาศาสตร์ ระดับมัธยมศึกษา ตอนปลาย ในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ ประจำปี 2543 โดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัด เชียงใหม่ รางวัลการนำเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบบรรยาย ในระดับดีมาก ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 3 ประจำปี 2547 “บัณฑิตวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ที่ชาติ ต้องการ” โดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
งานวิจัยเผยแพร่	ทุนอุดหนุนวิจัยระดับปริญญาโท โดยสำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 3 ประจำปี 2547 (ภาคบรรยายและโปสเตอร์) เรื่อง “การเพาะเลี้ยงแคลลัสและการถ่ายยีนในข้าว เหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม” วันที่ 7 มีนาคม 2548 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2548 (ภาคบรรยาย) เรื่อง “การถ่ายยีนในข้าว เหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม”

## งานวิจัยเผยแพร่

ระหว่างวันที่ 19 -20 พฤษภาคม 2548 ณ ศูนย์การศึกษานานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31 (ภาคโปสเตอร์) เรื่อง “การพัฒนาระบบการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย” ระหว่างวันที่ 18 – 20 ตุลาคม 2548 ณ เทคโนโลยีธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการนานาชาติประจำปีของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19 (ภาคบรรยาย) เรื่อง “Transformation of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*” ระหว่างวันที่ 9 – 12 ตุลาคม 2550 ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ Bioasia 2007 (ภาคโปสเตอร์) เรื่อง “Improvement of Transformation System of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L.) Variety RD 6 using *Agrobacterium tumefaciens*” ระหว่างวันที่ 5 – 9 พฤศจิกายน 2550 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 6 ประจำปี 2547 (ภาคบรรยายและโปสเตอร์) เรื่อง “การถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่แคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย” วันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2551 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่