

ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร N6 คัดแปลง พบว่าอาหารสูตร N6 คัดแปลงที่มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัสสูงสุดร้อยละ 74.19 เมื่อนำแคลลัสที่ถูกคั่งน้ำออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 คัดแปลงที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดสูงสุดร้อยละ 55 และชักนำยอดให้เกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 คัดแปลงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ต้นข้าวที่สมบูรณ์นี้สามารถรอดชีวิตได้เมื่อนำออกปลูกในกระถางที่มีดินอยู่ในสภาพน้ำขัง

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินและซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าความเข้มข้นของกานามัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนคือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่แคลลัสข้าวสามารถทนต่อซีโฟแทกซิมได้สูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 พบว่าซีโฟแทกซิมเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Agrobacterium* ได้

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 โดยมีเวกเตอร์แบบ binary vector ซึ่งมีพลาสมิดแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ pBIN1011 (มีโปรโมเตอร์ CaMV35S แต่ไม่มีส่วนของยีนแคลเรติคิวลิน) pBIN1311 (มีโปรโมเตอร์ CaMV35S ร่วมกับส่วนของยีนแคลเรติคิวลิน) และ pBIN2311 (มีโปรโมเตอร์ *A*HSP ร่วมกับยีนแคลเรติคิวลิน) โดยทุกพลาสมิดมียีน *nptII* ทำให้พืชที่ได้รับยีนนี้สามารถต้านทานต่อกานามัยซิน หลังจากทำการ co-cultivation และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีกานามัยซินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินร้อยละ 10.81, 14.58 และ 15.15 เมื่อมีการส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pBIN1011, pBIN1311 และ pBIN2311 ตามลำดับ และพบว่ามีเพียงหนึ่งแคลลัสจากจำนวนแคลลัสทั้งหมด 30 แคลลัสซึ่งได้รับการส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pBIN1311 ที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้แต่มีลักษณะเหี่ยว เมื่อตรวจสอบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากแคลลัสที่สามารถต้านทานต่อกานามัยซินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *GFP* และแคลเรติคิวลิน พบว่าได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงตามที่คาดการณ์ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ามีการแทรกสอดของยีนแบบเสถียรในจีโนมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเพียงร้อยละ 0.51

Effects of plant growth regulators on seed cultures of rice cv. KDML105 were carried out on modified N6 medium. It was found that the suitable medium for callus formation was N6 medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D which induced the highest percentage of callus formation (74.19%). The suitable medium for plant regeneration from dehydrated calli was modified N6 medium added with 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l BA which induced the highest percentage of calli forming shoots (55.00%). Rootings were obtained when the shoots were transferred to modified N6 medium without growth regulators and complete plantlets could survive after transplanting to soil.

Effects of kanamycin and cefotaxime on callus growth of rice cv. KDML105 were also studied. Kanamycin at 100 mg/l was suitable for the selection of transformed calli while rice calli conferred resistance to cefotaxime concentrations up to 500 mg/l. In addition, cefotaxime at 250 mg/l was effective to inhibit growth of *A. tumefaciens* strain GV3101.

Three weeks old rice calli cv. KDML105 were transformed with *A. tumefaciens* strain GV3101 harboring binary vectors carrying each type of plasmids; pBIN1011 (CaMV35S promoter without calreticulin gene), pBIN1311 (CaMV35S promoter and calreticulin gene), and pBIN2311 (*AtHSP* and calreticulin gene). All of these plasmids contain the *nptII* gene for kanamycin resistance. After co-cultivation and 4 weeks of selection on medium containing kanamycin, we found that the percentages of kanamycin resistant calli were 10.81%, 14.58% and 15.15% when rice calli were transformed with pBIN1011, pBIN1311 and pBIN2311, respectively. Only one callus out of 30 calli which were transformed with pBIN1311 was able to regenerate into a whole plant but it was albino. PCR analysis of callus genomic DNA from kanamycin resistant calli using GFP and calreticulin genes specific primers showed the expected products. This result indicates that there was the stable integration of calreticulin gene in rice genome of KDML105 with 0.51% transformation efficiency.