บทคัดย่อ

171454

ในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 60 และ สุพรรณบุรี 90 เพื่อให้ได้ข้าวแปลงพันธุ์ที่มีความเสถียรนั้น จำเป็นต้องปรับปรุงประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสข้าวเจริญเป็นต้นอ่อนก่อน สูตรอาหารที่เหมาะสมและสามารถชักนำให้เมล็ดข้าวเกิดแคลลัส คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4 -D ความเข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 2.5 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเซต 500 มก./ล. ภายใต้สภาวะที่มีแสง โดยทำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 60 และ สุพรรณบุรี 90 เกิดแคลลัสได้ 85.7 89 84.5 และ 81 % ตามลำดับ ในการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นอ่อน ต้องดึงน้ำออกจากแคลลัสก่อน โดยการวางในจานเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และสูตรอาหารที่เหมาะสมในชักนำให้แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เกิดยอดคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ และเคซีนไฮโดรไลเซต 300 มก./ล. อาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และสุพรรณบุรี 90 เกิดยอดได้ดี คือ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ IAA 5 ไมโครโมลาร์และน้ำมะพร้าวร้อยละ 15 ส่วนแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี ในอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มก./ล. และน้ำมะพร้าวร้อยละ 15 ในการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของแคลลัส พบว่า ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มก./ล. เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกต้นข้าวแปลงพันธุ์ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1 และสุพรรณบุรี 90 ที่ทนทานต่อไฮโกรมัยซิน ในขณะที่ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกต้นข้าวแปลงพันธุ์สุพรรณบุรี 60 คือ 20 มก./ล. สำหรับความเข้มข้นสูงสุดของซีโฟแทกซีมที่แคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ทนได้คือ 400 มก./ล. ส่วนความเข้มข้นสูงสุดของซีโฟแทกซีมที่แคลลัสข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 60 และ สุพรรณบุรี 90 ทนได้คือ 250 มก./ล. ในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่มียีน chitinase ยีน GUS (ยีนรายงานผล) และยีน *hptII* (ยีนคัดเลือก) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมใน

การบ่มแคลลัสข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และสุพรรณบุรี 1 ร่วมกับ *A. tumefaciens* คือ 30 และ 10 นาที ตามลำดับ ขณะที่ระยะเวลาที่เหมาะสำหรับการบ่มแคลลัสข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 และสุพรรณบุรี 90 ร่วมกับ *A. tumefaciens* คือ 40 นาที เมื่อเติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ในสารแขวนลอย *A. tumefaciens* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 60 และสุพรรณบุรี 90 ส่วนการศึกษาการส่งถ่ายยีนไคทิเนสสู่ข้าว โดยวิธีตรงโดยใช้ particle bombardment จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าว โดยวิธี particle bombardment คือ ใช้แรงดันของก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 900 ปอนด์/ตร.นิ้ว สำหรับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์/ตร.นิ้ว สำหรับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และสุพรรณบุรี 90 ขณะที่แรงดันก๊าซฮีเลี่ยมที่เหมาะสมสำหรับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 คือ 900 – 1,100 ปอนด์/ตร.นิ้ว โดยมีระยะห่างระหว่าง stopping screen กับแคลลัสของข้าวเท่ากับ 12 ซม. นอกจากนี้ยังพบว่า การวางบนอาหารที่มีแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ก่อน 4 ชั่วโมงและหลังการส่งถ่ายยีนอีก 20 ชั่วโมง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวได้ ซึ่งเมื่อใช้วิธีตรวจสอบการสอดแทรกของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) พบว่า มีการสอดแทรกของยีนไคทิเนส ยีน GUS และยีน *hptII* ในแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายยีนของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ จากการทดลองสามารถคัดเลือกต้นข้าวแปลงพันธุ์บนอาหาร MS ที่เติมไฮโกรมัยซินจำนวน 4 ต้น โดยพบว่า มีการแสดงออกของยีน GUS และตรวจพบการสอดแทรกของยีนโดยวิธี PCR เมื่อทำการสกัดใบข้าวแปลงพันธุ์ เพื่อตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไคทิเนสในการย่อยสับเสตรทคือ colloidal chitin พบว่า สารสกัดใบข้าวแปลงพันธุ์ทั้ง 4 ต้น มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคทิเนสสูงกว่าสารสกัดจากใบข้าวที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนซึ่งเป็นชุดควบคุม นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสกัดจากใบข้าวแปลงพันธุ์ทั้ง 4 ต้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้ โดยแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ABSTRACT

171454

As prerequisites for generating stable transformed rice (*Oryza sativa* L.) cv. Chainat 1, Suphanburi 1, Suphanburi 60 and Suphanburi 90, efforts were made to improve the efficiency of regeneration systems for rice cv. Chainat 1 , Suphanburi 1, Suphanburi 60 and Suphanburi 90. The suitable medium was N_6 medium supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 2.5 μM NAA and 500 mg/l casein hydrolysate under light condition. The result showed the percentages of callus induction from seeds of rice cv. Chainat 1, Suphanburi 1, Suphanburi 60 and Suphanburi 90 were 85.7, 89, 84.5 and 81 , respectively. The calli were dehydrated in a petridish for 5 days before being transferred to regeneration medium. The suitable medium for shoot regeneration from the calli of rice cv. Chainat 1 was MS medium supplemented with 9 μM BA, 1 μM NAA and 300 mg/l casein hydrolysate. The calli of rice cv. Suphanburi 1 and Suphanburi 90 were successfully regenerated on MS medium supplemented with 9 μM BA, 5 μM IAA, 300 mg/l casein hydrolysate and 15 % (v/v) coconut water. The highest regeneration percentage of rice cv. Suphanburi 60 was obtained when the calli were cultured on MS medium containing 9 μM BA, 1 μM NAA , 300 mg/l casein hydrolysate and 15 % (v/v) coconut water. The experiments were conducted to determine the effect of antibiotics on callus induction. It was found that hygromycin concentration at 30 mg/l was effective for transformant selection of rice cv. Chainat 1, Suphanburi 1 and Suphanburi 90 while the effective concentration of hygromycin for selecting transformants of rice cv. Suphanburi 60 was 20 mg/l. The highest concentration of cefotaxime that the calli of rice cv. Chainat 1 could tolerate was 400 mg/l and the highest concentration of cefotaxime that the calli of rice cv. Suphanburi 1, Suphanburi 60 and Suphanburi 90 could tolerate were 250 mg/l. The genetic transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain

LBA4404, which harbored the plasmid pCAMBIA 1305.1 containing chitinase gene, β-glucuronidase (GUS) and hygromycin resistance (*hptII*), was used in the procedure. The optimal co-cultivation times for rice cv. Chainat 1 and Suphanburi 1 were 30 and 10 minutes, respectively. The optimal co-cultivation times for rice cv. Suphanburi 60 and Suphanburi 90 were 40 minutes. The presence of 200 μM acetosyringone was tested and it was found that acetosyringone could improve transformation efficiency of rice cv. Chainat 1, Suphanburi 60 and Suphanburi 90. Particle bombardment was also used to transform chitinase gene. The results revealed that the optimum helium pressure for particle bombardment of rice cv. Chainat 1 was 900 psi. While the helium pressure of 1,100 psi was optimum for rice cv. Suphanburi 1 and Suphanburi 90. The suitable helium pressure for particle bombardment of rice cv. Suphanburi 60 was in the range of 900 - 1,100 psi . The optimal distance from stopping screen to rice callus was 12 cm. Culture of rice calli on medium containing 0.4 M mannitol 4 h prior to and 20 h after bombardment brought about the highest transformation efficiency. PCR method confirmed the integration of chitinase gene, selectable marker and screenable marker in the transformed tissues. Four transformed plantlets were obtained through hygromycin selection. The GUS assay revealed the gus activity while the PCR method indicated the integration of marker gene. Chitinase activity was detected in crude extracts of transformed leaves using colloidal chitin as a substrate. It was found that the chitinase activity of transformed leaves was higher than that of the control. Crude extracts of transformed leaves were tested for inhibition of growth of *Rhizoctonia solani* and the results showed a significant reduction of fungal growth.