212957

บทคัดย่อ

เทคนิคพันธุวิศวกรรมสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการถ่ายยีนในข้าว การศึกษาการถ่ายยีนในข้าวจำเป็นที่จะต้องมีสภาวะในการเพาะเลี้ยงแคลลัส และการชักนำให้เกิดต้นที่เหมาะสม เพื่อให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวเหนียวหลายสายพันธุ์และการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม การทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวบนอาหารสูตร N6D ที่มีความเข้มข้นของโพรลีนและ 2,4-D ต่างๆกัน พบว่าข้าวเหนียวเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อใช้โพรลีนความเข้มข้น 1.44 หรือ 2.88 ก./ล. ส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมคือ 2 หรือ 4 มก./ล. เมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA และไคเนติน พบว่าแคลลัสของข้าวเหนียวส่วนใหญ่ที่ใช้ทดลองสามารถเจริญเป็นต้นได้ ยกเว้นข้าวเหนียวแพร่ และกข 10

การศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง โดยศึกษาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัส พบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ได้

212957

ศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวเหนียวโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มี binary vector pCAMBIA1303 ซึ่งมียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายอโกรแบคทีเรียม คือ 15 นาที โดยให้แคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซิน มีการแสดงออกของยีน *gusA* และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ จากการวิเคราะห์ต้นข้าวในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าว และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า มีการแทรกของยีนในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวกข 6 พบว่าไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 15 มก./ล. เหมาะสมที่จะใช้คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน เมื่อทำการศึกษาการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 (pCAMBIA 1303) พบว่ามีแคลลัสประมาณ 24.24 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาไฮโกรมัยซินเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ และแคลลัสที่ต้านทานต่อยาไฮโกรมัยซินมีการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ β - glucuronidase เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัสและต้นข้าวที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hptII* พบว่ามียีนแทรกอยู่ในจีโนมของข้าว แสดงว่าสามารถถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างต้นข้าวเหนียวสันป่าตอง และกข 6 ดัดแปลงพันธุกรรม และได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมโดยถ่ายยีนที่สำคัญและพัฒนาให้ข้าวเหนียวมีผลผลิตสูงและมีคุณภาพที่ดีตามต้องการในอนาคตได้

ABSTRACT

212957

Genetic engineering can be used to improve rice varieties by gene transfer techniques. Transformation of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) requires suitable conditions for callus culture and plant regeneration for high transformation efficiency. In this study, callus culture of several Thai glutinous rice varieties and *Agrobacterium*-mediated transformation were investigated. Mature rice seeds were cultured on N6D medium containing different combinations of proline and 2,4-D concentrations. The results showed that all varieties studied produced high percentage of callus formation at 1.44 or 2.88 g/l proline and 2 or 4 mg/l 2,4-D. The calli were regenerated on MS medium containing NAA and kinetin. It was found that all varieties except Phare and RD 10 were able to be regenerated into plantlets.

Agrobacterium–mediated gene transfer for glutinous rice cv. Niaw Sanpahtawng were performed. The effects of certain factors on rice transformation were studied to

improve transformation efficiency. It was found that the antibiotic hygromycin concentration for selection of transformed Niaw Sanpahtawng calli was 50 mg/l which inhibited growth of untransformed calli about 92%. *Agrobacterium. tumefaciens* strain AGL1 harboring binary vector pCAMBIA1303 containing genes for hygromycin resistance (*hptII*) and β-glucuronidase (*gusA*) were used for transformation. The infection time of 15 min produced the highest percentage (54.37%) of hygromycin-resistant calli. The calli showed the expression of *gusA* gene and were developed to rice plants. PCR analysis of leaf genomic DNA from transformed plants was conducted using primers specific to *gusA* and *hptII* genes. The result indicated that the *hptII* and *gusA* genes were integrated into the rice genome. The first transgenic Niaw Sanpahtawng was normally grown in the greenhouse.

Transformation of rice cv. RD 6 was studied. Hygromycin concentration at 15 mg/l was suitable for selection of transformed calli. Transformation of RD 6 by *Agrobacterium tumefaciens* were performed using *Agrobacterium* strain AGL1 (pCAMBIA 1303). We found that 24.24 percentage of calli surviving on media supplemented with hygromycin. Hygromycin-resistant calli were GUS positive. PCR analysis of genomic DNA from hygromycin-resistant calli and plants using primers specific to *hptII* gene indicated the stable integration of genes in transformed calli and rice plants.

Overall, the transgenic glutinous rice plants varieties, Niaw Sanpahtawng and RD 6, were developed. This research provided the promising results for future improvement of Thai rice varieties with increased yields and quality by genetic engineering.