



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแสดงออกของโคตินีนสจากกระถินบ้าน
ในข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ขาวเมฆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
จังหวัดปทุมธานี

30 เมษายน 2549



สัญญาเลขที่ MRG4680012

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแสดงออกของโคตินีนสจากกระถินบ้าน
ในข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ขาวเมฆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์
จังหวัดปทุมธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	MRG4680012
ชื่อโครงการ	การแสดงออกของไคตินเนสจากกระถินบ้านในข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น
ผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานะ ขาวเมฆ
ที่ติดต่อ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180 โทร. 02-9093042 แฟกซ์ 02-90930411 kaomek@mail.vru.ac.th , kaomek@yahoo.co.th
ระยะเวลาโครงการ	2 ปี

การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนไคตินเนสจากกระถินบ้านในข้าวไทยดอกมะลิ 105 และข้าวญี่ปุ่นโกชิฮิการิ ด้วยอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1300 เป็นตัวพาหะ หลังจากเพาะเมล็ดข้าวทั้งสองชนิดเป็นแคลลัส และสร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีน chitinase, CaMV35S และ NOS แล้วถ่ายยีนไคตินเนสเข้าไปในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ แล้วตรวจการแสดงออกด้วยวิธี PCR, Northern blot gel, Southern blot gel และ gus assay พบว่าการแสดงออกของยีนไคตินเนส และยีน gus ในข้าวดอกมะลิ 105 จะมีมากกว่าในข้าวโกชิฮิการิ โดยจะมีการแสดงออกในทุกๆ ส่วนของข้าวทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีการแสดงออกน้อยที่สุดในราก ส่วนใน ใบ ลำต้น และเมล็ด จะมีการแสดงออกของยีนไคตินเนสและยีน gus มาก แสดงว่ายีนไคตินเนสจะมีในใบ ต้น และเมล็ดมากกว่าในราก เมื่อทดสอบการต้านเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ในดินข้าวทั้งข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นปรากฏว่าต้นข้าวที่ได้รับการสเปรย์เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนั้นสองวันต้นข้าวมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเหลือง และเมื่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ต้นข้าวเหี่ยว ใบเกิดจุดสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ไม่มียีนของไคตินเนสจะไม่สามารถต้านทานเชื้อรา จึงทำให้เกิดโรคเชื้อราในข้าวได้

Abstract

Project Code MRG4680012

Project Title Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Indica rice) and Japonica rice.

Investigator Assistant Professor Dr.Mana Kaomek

Address Science and Technology Faculty, Valaya Alonkorn Rajabhat University, Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 13180.

Tel. 02-9093042, Fax 02-9093041

E-mail: kaomek@mail.vru.ac.th, kaomek@yahoo.co.th

Project Period 2 Years

The objective of this research is study the expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Dawk Mali 105) and Japonica rice (Koshihigari) by agrobacterium with pCAMBIA 1300. Callus of Khao Dawk Mali 105 and Koshihigari were produced and transformed with agrobacterium with pCAMBIA 1300 + NOS + chitinase and promoter CaMV35S. After that they were checked the expression of chitinase and gus by PCR, Northern blot gel, Southern blot gel and gus assay. Chitinase and gus shown to express in all part of two rice, such as callus, leave, root, and seedling but they shown little expression in root of two rice. For antifungal of rice chitinase, they shown antifungal the *Fusarium moniliforme*.

Keywords: chitinase, calli, *Leucaena leucocephala* de Wit, Khao Dawk Mali 105, and Koshihigari

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์ด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ อาร์. เกตุทัต คาร์นส์ สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำต่าง ๆ และขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ในการอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และอำนวยความสะดวกในการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวแห่งชาติ คลองหก จังหวัดปทุมธานี ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวแห่งชาติ จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวโกชิจิการ์ เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

มานะ ขาวเมฆ

30 เมษายน 2549

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญภาพ	(6)
สารบัญตาราง	(9)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	3
การดำเนินงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ข้าวดอกมะลิ 105	5
ข้าวโกชิการิ	6
การถ่ายยีนในข้าว	7
กลไกการถ่ายทอดยีนของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	7
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
อุปกรณ์	14
สารเคมี	14
วิธีการวิจัย	16
1. สร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีนไคตินเนสจากกระถินบ้าน	16
2. การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดเป็นแคลลัส	22
3. การ transformed recombinant DNA ที่มีไคตินเนสเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	22
4. การถ่ายยีนไคตินเนสเข้าแคลลัสข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิการิ	24
5. การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
6. การตรวจสอบยีนไคตินเนสในแคลลัสและส่วนต่างๆ ของข้าว	25
7. การทดสอบการต้านเชื้อราสายพันธุ์ <i>Fusarium moniliforme</i> ของต้นข้าว	35
บทที่ 4 ผลการวิจัย	36
สร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีนไคตินเนสจากกระถินบ้าน	36
การศึกษากาการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจิการให้เจริญเป็นแคลลัส	46
แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนไคตินเนส	50
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคตินเนสโดยวิธี PCR	54
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคตินเนสโดยวิธี Northern blot	55
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคตินเนสโดยวิธี Southern blot	60
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน gus โดยวิธี gus assay	64
การต้านทานเชื้อราสายพันธุ์ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ของต้นข้าว	67
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ	69
สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย	69
ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม	71
ภาคผนวก	76
ภาคผนวก ก.	77
ภาคผนวก ข.	88
Output	96

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 การสร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีนไคตินเนส	21
4.1 ลำดับเบสของไคตินเนสที่ได้จากโครมาโตแกรมและแปลเป็นกรดอะมิโน	37
4.2 จุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในลำดับเบสของไคตินเนส	38
4.3 โครมาโตแกรมของไคตินเนสในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ forward primer โคลนที่ 1	39
4.4 โครมาโตแกรมของไคตินเนสในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ reverse primer โคลนที่ 1	39
4.5 โครมาโตแกรมของไคตินเนสในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ forward primer โคลนที่ 2	40
4.6 โครมาโตแกรมของไคตินเนสในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ reverse primer โคลนที่ 2	40
4.7 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pUC19 และไคตินเนสที่ถูกตัดด้วย <i>Bam</i> H I และ <i>Sac</i> I	41
4.8 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pBI121 และไคตินเนสที่ถูกตัดด้วย <i>Bam</i> H I และ <i>Sac</i> I	41
4.9 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pBI121 และ promoter ที่ถูกตัดด้วย <i>Bam</i> H I และ <i>Sac</i> I	41
4.10 แบนด์ขนาด 8.958 bp ของพลาสมิด pCAMBIA 1300	44
4.11 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pCAMBIA 1300, promoter CaMV35S + chitinase + NOS	45
4.12 แคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 2 สัปดาห์	47
4.13 แคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 5 สัปดาห์	47
4.14 แคลลัสของข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร RN ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์	48
4.15 แคลลัสของข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร RN ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์	48
4.16 ดันข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร RN ในที่สว่างเป็นเวลา 7 สัปดาห์	49
4.17 ดันข้าวที่เพาะลงดินในที่สว่างเป็นเวลา 1 สัปดาห์	49
4.18 ดันข้าวที่เพาะลงดินในที่สว่างเป็นเวลา 2 สัปดาห์	50
4.19 แคลลัสข้าวที่ทำการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 5 สัปดาห์	52
4.20 แคลลัสข้าวที่ทำการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร RN เป็นเวลา 8 สัปดาห์	52
4.21 ดันข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RN ในที่สว่างเป็นเวลา 10 สัปดาห์	53
4.22 ดันข้าวที่เพาะลงดินเป็นเวลา 4 สัปดาห์	53
4.23 ขนาดแบนด์ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวดอกมะลิ 105	54
4.24 ขนาดแบนด์ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวโกชิจิการิ	55
4.25 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 1 เดือน	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.26 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 2 เดือน	57
4.27 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 3 เดือน	58
4.28 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 4 เดือน	59
4.29 DNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 1 เดือน	60
4.30 DNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 2 เดือน	61
4.31 DNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 3 เดือน	62
4.32 DNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวอายุ 4 เดือน	63
4.33 จุดสีน้ำเงินของ gus gene จากแคลลัสข้าวที่มีการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301	64
4.34 จุดสีน้ำเงินของ gus gene จากในและต้นข้าวที่มีการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301	65
4.35 จุดสีน้ำเงินของ gus gene จากรากและเมล็ดข้าวที่มีการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301	66
4.36 ต้นข้าวก่อนการฉีดพ่นเชื้อรา	67
4.37 ต้นข้าวดอกมะลิ 105 หลังฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ <i>F. moniliforme</i> เป็นเวลา 3 วัน	68
4.38 ต้นข้าวโกชิจิการิหลังการฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ <i>F. moniliforme</i> เป็นเวลา 3 วัน	68
ข. 1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)	88
ข. 2 ตู้อบ (hot air oven)	88
ข. 3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow biohazard cabinet)	89
ข. 4 ตู้เพาะเมล็ดพืช (growth chamber)	89
ข. 5 เครื่องเขย่า (incubator shaker; orbital)	90
ข. 6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrometer)	90
ข. 7 เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ (refrigerated Incubator shaker)	91
ข. 8 เครื่องชั่ง (balance)	91
ข. 9 เครื่องผสมสาร (vertex mixer)	92
ข.10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction; PCR)	92
ข.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)	93
ข.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (centrifuge)	93
ข.13 เครื่องแยกโปรตีนโดยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข.14 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)	94
ข.15 พลาสมิด pCAMBIA 1301	95
ข.16 พลาสมิด pCAMBIA 1300+chitinase	95

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 อัตราการเกิดแคลลัสที่ได้จากการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105	46
4.2 อัตราการเกิดแคลลัสที่ได้จากการชักนำเมล็ดข้าวโกซิชิการิ	46
4.3 จำนวนแคลลัสข้าวคอกมะลิ 105 ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ 1301	51
4.4 จำนวนแคลลัสข้าวคอกมะลิ 105 ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300+chitinase	51
4.5 จำนวนแคลลัสข้าวโกซิชิการิที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ 1301	51
4.6 จำนวนแคลลัสข้าวข้าวโกซิชิการิที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300+chitinase	51

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เอนไซม์ไคตินเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยพันธะเบตา-1,4-เอ็น-อะซิดิล-ดี-กลูโคซามีน (β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine) ของไคตินในเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด ไคตินไม่มีในพืชชั้นสูง แต่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ในพวกลี้น้ำและเชื้อรา แมลง กุ้ง และปู ไคตินจะมีความสำคัญมากในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ เพราะต้องใช้ในการเจริญเติบโตและการลอกคราบ (Jakopitsch, *et. al.*, 1999) แต่แบคทีเรียใช้เอนไซม์ไคตินเนสในการย่อยสลายไคตินเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Hakala, *et. al.*, 1993) พืชผลิตเอนไซม์ไคตินเนสไว้สำหรับยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และพืชบางชนิดเมื่อได้รับการใส่ยีนส์ไคตินเนสเข้าไป จะสามารถต่อต้านการเกิดโรคจากเชื้อรา (Boller, 1988) เอนไซม์ไคตินเนสแบ่งตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ประเภทคือ เอนโดไคตินเนส (endochitinase) และเอกซ์โซไคตินเนส (exochitinase) (Morgavi, *et. al.*, 1994) เอนไซม์ไคตินเนสจากพืชส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ประเภทเอนโดไคตินเนส ซึ่งจะย่อยสลายพันธะภายในของเบตา-1,4-เอ็น-อะซิดิล-ดี-กลูโคซามีน แบบสุ่มคือ ตัดที่ตำแหน่งที่ 1, 2, 3, 4,... ได้ผลิตภัณฑ์เป็น เอ็น-อะซิดิล-ดี-กลูโคซามีน ไคโตไบโอส (chitobiose) ไคโตไตรโอส (chitotriose) และ ไคโตเตตระโอส (chitotetraose) ตามลำดับ

เอนไซม์ไคตินเนสจะมีอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชจะมีหน้าที่สำคัญคือสามารถยับยั้งเชื้อโรคชนิดต่างๆ ที่เกิดกับพืช จากการศึกษาวิเคราะห์แอกติวิตีพบว่า เอนไซม์ไคตินเนสจะมีแอกติวิตีสูงขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อรา เอริลิน ฮอร์โมน สารเคมี โลหะหนัก (Boller, 1987) และสามารถยับยั้งการเกิดโรคพืชจากเชื้อราได้ดีเมื่อถ่ายยีนส์เข้าไปในพืช (Collinge, *et. al.*, 1993) เอนไซม์ไคตินเนสสามารถละลายอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชได้เช่น ในช่องว่างของไลโซมอล เยื่อเซลล์ หรือผนังเซลล์ ไมโครโซมอล และสารละลายต่างๆ (Humphreys, and Gooday, 1984)

เอนไซม์ไคตินเนสจากพืชมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-40 กิโลดาลตัน จากลำดับกรดอะมิโนสามารถแบ่งเอนไซม์ไคตินเนสเป็น 6 คลาส (classes) และ 2 แฟมิลี (family) โดยโครงสร้างไม่มีความสัมพันธ์กันคือ แฟมิลี 18 และแฟมิลี 19 ของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิลไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase) เอนไซม์ไคตินเนสแฟมิลี 18 แบ่งเป็นออกเป็น 3 คลาส (classes) คือ คลาสที่ 3 คลาสที่ 5 และ คลาสที่ 6 ซึ่งจะพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย พืช เชื้อรา แมลง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และไวรัส เอนไซม์ไคตินเนสแฟมิลี 19 พบเฉพาะ

ในพืชเท่านั้น ซึ่งอยู่ในคลาสที่ 1 คลาสที่ 2 และคลาสที่ 4 ไคตินเอสคลาสที่ 1 มีโครงสร้างอยู่ในรูปกรดและเบส ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในกลางแวกคิวโอล (vacuole) ไคตินเอสคลาสที่ 1 มีการรักษาคำแหน่งของคะตะไลติกโดเมน (catalytic domain) และซิสเทอีน-ริชโดเมน (cysteine-rich domain) ที่ปลายด้าน N-terminal สูงคล้ายกับรับเบอร์เฮวิน (rubber hevein) ตำแหน่งซิสเทอีนริชโดเมนจะเป็นบริเวณสำหรับไคตินจับ ส่วนคะตะไลติกโดเมนและซิสเทอีนริชโดเมนจะถูกแยกออกจากกัน โดยส่วนของไกลซีนและโปรลีนซึ่งส่วนของคะตะไลติกโดเมนจะมีบทบาทในการยับยั้งเชื้อรา เอนไซม์ไคตินเอสในกลุ่มที่ 2 มีโครงสร้างอยู่ในรูปกรดและเบสซึ่งมีปริมาณของซิสเทอีน-ริชโดเมนน้อย แต่ลำดับกรดอะมิโนของคะตะไลติกโดเมนของคลาสที่ 1 เอนไซม์ไคตินเอสในคลาสที่ 2 พบในของเหลวออกเซลล์ของใบไม้และในส่วนของอะพลาสติก (apoplastic) เอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 3 มีโครงสร้างอยู่ในรูปกรดคล้ายกับเอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 2 แต่มีโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนต่างจากเอนไซม์ไคตินเอสในคลาสที่ 1 คลาสที่ 2 และคลาสที่ 4 เอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 3 จะอยู่ในส่วนประกอบนอกเซลล์ เอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 4 จะมีส่วนของบริเวณไคตินมาจับและมีโครงสร้างเหมือนกับคลาสที่ 1 แต่จะมีส่วนที่หายไป 4 แห่ง คือบริเวณไคตินจับ 1 แห่ง บริเวณเร่ง 2 แห่ง และบริเวณปลายด้าน C-terminal 1 แห่ง เอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 5 จะมีความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างน้อยมากเพราะมาจากหลายสปีชีส์ ส่วนเอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 6 จะมีโครงสร้างของกรดอะมิโนเหมือนกับคลาสที่ 5 แต่โครงสร้างบางส่วนของคลาสที่ 5 หายไป 1 แห่ง (Menis, *et. al.*, 1994) ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 1 และคลาสที่ 2 มีความคล้ายกัน 60-65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในคลาสเดียวกันจะมีความคล้ายกันมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ไคตินเอสในคลาสที่ 4 จะมีความคล้ายกันมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และจะมีความคล้ายกัน 30-35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับคลาสที่ 1 และคลาสที่ 2

เอนไซม์ไคตินเอสคลาสที่ 1 จากกระถินบ้านที่แสดงออกในแบคทีเรีย เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยเอนไซม์ไคตินเอสจากกระถินบ้านในเพลทที่มีเชื้อราแต่ละชนิด จำนวน 14 ชนิด ปรากฏว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้ถึง 13 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าเอนไซม์ไคตินเอสจากแหล่งต่าง ๆ (Kaomek, 2002) นอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเองแล้ว ในพืชบางชนิดเอนไซม์ไคตินเอสยังทำงานร่วมกับ เบต้า-1,3 กลูโคซานเนส (β -1,3 glucanase) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทั้งเอนไซม์ไคตินเอส และเบต้า-1,3 กลูโคซานเนส ถูกเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์ในขณะพืชได้รับเชื้อราที่เป็น pathogen และโดย fungal elicitor นอกจากนี้เอนไซม์ไคตินเอสยังถูกเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์ได้โดยสารอื่นที่ไม่ใช่ phytopathogen เช่น โดย เอทิลีน (ethylene) เอเบล (Abeles, *et. al.*, 1970) พบว่าใบถั่วที่ได้รับเอทิลีนมีปริมาณไคตินเอส เพิ่มขึ้นถึง 48 เท่า หลังจากได้รับเอทิลีน 3 วัน ปัจจัยเหนี่ยวนำอื่นได้แก่ auxin, cytokinin, kinetin, chitosan, pectic, polysaccharides, $HgCl_2$,

2,4 dichlorophenoxyacetic acid, CrO_3 , salicylic acid และถูกเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์เมื่อเกิด mechanical injury หรือ wounding ในพืช หรือภายใต้ osmotic stress

จากคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ไคตินเนส เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอนไซม์กับการยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคตินเนสจากพืชโดยเฉพาะพืชตระกูลถั่วที่มีความเกี่ยวข้องในการตรึงไนโตรเจนอีกด้วย จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจในการศึกษาเอนไซม์ไคตินเนสจากพืชที่สนใจอยู่ในแฟมิลี 19 ของเอนไซม์พวกไกลโคซิลไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase) โดยถ่ายยีนไคตินเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านเข้าสู่แคลลัสข้าวเพื่อศึกษาการแสดงออกและการยับยั้งเชื้อราของต้นข้าวที่ถูกถ่ายยีนไคตินเนสเข้าไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาและเปรียบเทียบการแสดงออกและการยับยั้งเชื้อราของต้นข้าวหอมมะลิไทย (Indica rice) และข้าวญี่ปุ่น (Japonica rice) ที่ถูกถ่ายยีนไคตินเนสเข้าไป
2. เพื่อเป็นแนวทางในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว

การดำเนินงานวิจัย

1. สร้างพลาสมิด (pCAMBIA 1300 และ 1301 มี Gus gene สามารถตรวจสอบได้) ที่มีไคตินเนสจากกระถินบ้านโดยการตัดต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)
2. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสข้าวจากเมล็ดข้าวดอกมะลิไทย 105 และข้าวญี่ปุ่น โกชิอิการิ
3. ทรานส์ฟอร์ม (transform) พลาสมิดที่มียีนไคตินเนสเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย (agro-bacterium)
4. ถ่ายยีนไคตินเนสเข้าสู่แคลลัสข้าว (Transgenic rice) ด้วยอะโกรแบคทีเรีย
5. เพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวที่มียีนไคตินเนสบนยาปฏิชีวนะ เพื่อคัดเลือกแคลลัสที่มีพลาสมิดและยีนไคตินเนสอยู่
6. เพาะเลี้ยงต้นอ่อนของต้นข้าว และวิเคราะห์การแสดงออกในต้นข้าว จากใบ ต้น เมล็ด และราก โดยวิธีนอร์เทิร์นบลอต (northern blot) วิธีเซาเทิร์นบลอต (southern blot) เป็นระยะๆ ประมาณ 15-30 วันต่อครั้ง พร้อมทั้งทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยการพ่นเชื้อราบนต้นข้าวโดยตรง
7. เปรียบเทียบผลที่ได้กับต้นข้าวที่ไม่มียีนไคตินเนส และระหว่างข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น
8. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนงานวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้พันธุ์ข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวโกธิฮิการิที่ต้านทานเชื้อราได้
2. เป็นพื้นฐานสำหรับงานวิจัยในด้านการถ่ายยีนส์เข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว
3. ประยุกต์ใช้เอนไซม์โคติเนสในการยับยั้งเชื้อราจากพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวดอกมะลิ 105

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Oryza sativa</i> L.
ชื่อสามัญ	Jasmine rice ข้าวหอม
ชื่อพันธุ์	ข้าวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105)

ให้การรับรองแก่กรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์พืชขึ้นทะเบียนเลขที่ 33/2542 เมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม 2542 และเป็นพันธุ์พืชรับรองเลขที่ 15/2542 เมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2542

แหล่งที่มาและประวัติ

ข้าวขาวดอกมะลิ พบครั้งแรกในท้องที่แหลมประจู้ อำเภอนันทนิคม จังหวัดชลบุรี โดย นายจรูญ ดันชาวุธ ได้นำมาปลูกไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ.2488 เนื่องจากเป็นข้าวหอมที่ ขายได้ราคาสูงจึงได้แบ่งเมล็ดบางส่วนไปปลูกที่ท่าทองกลาง อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา จนกระทั่งปี พ.ศ. 2493-2510 กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้มีการรวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกใน 71 จังหวัด ของประเทศ เพื่อปลูกคัดเลือกพันธุ์ให้บริสุทธิ์ และประเมินผลผลิตซึ่ง นายสุนทร สีหะเนิน อดีตผู้อำนวยการสำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคเหนือ ที่มีตำแหน่งเป็นพนักงานข้าวอำเภอบางคล้า ในขณะนั้น ได้รวบรวมรวงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ จากอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 199 รวง แล้วส่งไปปลูกคัดพันธุ์ให้บริสุทธิ์ที่ สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง เมื่อ พ.ศ. 2498 หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2500 ได้นำไปปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์รับรองและแนะนำที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรงร่วมกับการปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ท้องถิ่นในนาเกษตรกรภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนกระทั่งปี 2502 คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์จึงได้ออกประกาศให้พันธุ์ข้าว “ข้าวดอกมะลิ 4-2-105” [เลข 4 หมายถึง ท้องถิ่นที่เก็บรวบรวม คือ อำเภอบางคล้า เลข 2 หมายถึง หมายเลขประจำพันธุ์ คือ พันธุ์ข้าว พันธุ์ที่ 2 (ดอกมะลิ) และ 105 หมายถึง รวงที่ 105] และแนะนำให้ขยายพันธุ์ เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2502 โดยให้ชื่อว่า “ดอกมะลิ 105” ซึ่งมักนิยมเรียกกันทั่วไปว่า “ข้าวหอมมะลิ”

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ข้าวดอกมะลิเป็นพืชประเภทพืชล้มลุก วงศ์หญ้า พวงข้าวเข้านาสวน ใว่ต่อช่วงแสง ต้นสูง 138 เซนติเมตร ทรงกอตั้ง ปล้องสีเขียว การล้มของลำต้นปานกลางใบ และกาบใบสีเขียว ใบมีขน ใบธงตั้งตรง การแก่ของใบปานกลางดอก ช่อดอก กลีบรองดอกสีฟางความยาวกลีบรอง

ดอกสั้น รวงยาวปานกลาง การยิดของคอรวงยาว จำนวนรวงต่อตารางเมตร 166 รวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง 132 เมล็ด เมล็ดยาวรีวมีเปลือกสีฟ้าและมีขน ยอดเมล็ดมีสีฟ้า ขนาดเมล็ดเฉลี่ยยาว 10.37 มิลลิเมตร กว้าง 2.48 มิลลิเมตร และหนา 1.96 มิลลิเมตร น้ำหนัก 1,000 เมล็ด เฉลี่ย 27.7 กรัม คิดเป็นน้ำหนักข้าวเปลือก 10.64 กิโลกรัมต่อถัง ข้าวกล้องสีขาว ขนาดเฉลี่ยยาว 7.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร และหนา 1.8 มิลลิเมตร

ลักษณะอื่น

ก. ระยะพักตัวของเมล็ด 8 สัปดาห์

ข. ปลุกได้เฉพาะฤดูนาปีโดยจะออกดอกประมาณวันที่ 25 ตุลาคม และเก็บเกี่ยวได้ประมาณวันที่ 25 พฤศจิกายน

ค. ผลผลิต 363 กิโลกรัมต่อไร่

ง. ข้อจำกัด : ลำต้นอ่อนลัมง่าย และมีทรงกอแผ่ ทำให้เกี่ยวได้ยาก ถ้าแก่ตุงงอมเกินไปจะไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ โรคใบสีส้ม และโรคใบหงิก อีกทั้งไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และหนอนกอ

จ. พื้นที่แนะนำ : ปลุกได้ในที่ลุ่มทั่วไปที่มีระดับน้ำลึกไม่เกิน 80 เซนติเมตร บริเวณนาฝน

ลักษณะประจำพันธุ์ดีเด่น

ทนแล้งได้ดีพอสมควรปลูกเป็นข้าวไร่ได้ ทนต่อสภาพและดินเปรี้ยวและดินเค็มเป็นข้าวต้นสูงอายุค่อนข้างน้อย จึงเก็บเกี่ยวได้ง่ายและเร็ว อีกทั้งเมล็ดนวดง่าย มีคุณภาพเมล็ดในเรื่องการขัดสีดี ได้เมล็ดข้าวสารใสและแข็งแรงแรง คุณภาพการหุงต้มดี ได้เมล็ดข้าวสุกมีกลิ่นหอมและอ่อนนุ่ม จึงจำหน่ายได้ราคาดี

ข้าวโกชิฮิการิ

ชื่อพันธุ์ข้าวโกชิฮิการิ (Khao Koshihikari)

ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร ให้เป็นพันธุ์แนะนำเมื่อวันที่ 22 กันยายน พ.ศ. 2538

แหล่งที่มาและประวัติ

สถาบันวิจัยข้าวเริ่มดำเนินงานเพื่อศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้น ตลอดจนความเป็นไปได้ในการปลูกข้าวญี่ปุ่นมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2507 โดยได้ดำเนินการที่สถานีทดลองข้าวพาน จังหวัดเชียงราย ต่อมาในปี พ.ศ. 2030 สถานีทดลองข้าวพานได้เก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นจากแหล่งต่างๆ มาขยายเมล็ดพันธุ์ จากนั้นนำไปปลูกศึกษาพันธุ์ขึ้นต้นเมื่อปี พ.ศ. 2531-2532 ปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ชั้นสูงที่

สถานีทดลองข้าวสันป่าตองเมื่อปี พ.ศ. 2532-2533 ปลุกเปรียบเทียบพันธุ์ระหว่างสถานี พ.ศ. 2533-2534 หลังจากนั้นนำไปปลูกทดสอบผลผลิตในนาเกษตรกรจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน พิชญโลก ชัยนาท สกลนคร และจังหวัดหนองคาย พร้อมทั้งบันทึกผลผลิต ลักษณะทาง เกษตรที่สำคัญข้อมูลอุตุนิยมวิทยาในช่วงฤดูปลูกตรวจสอบคุณภาพเมล็ดทางกายภาพและทางเคมี ตลอดจนทดสอบปฏิกิริยาต่อโรค และแมลงเมื่อปี พ.ศ. 2534-2535

ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวญี่ปุ่นเป็นข้าวเจ้านาสวนไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นสูงประมาณ 88 เซนติเมตร ต้นค่อนข้าง แข็งแรง กอตั้งตรง ใบแก่สีเขียวและมีขน กาบใบและปล้องสีเขียวใบธงค่อนข้างตั้งตรง รวงแน่น ไร่แก่ถึงออกรวงสั้น เมล็ดข้าวเปลือกสีฟางมีขนสั้น ขอดเมล็ดสีฟางและมีหางเล็กน้อย รูปร่างเมล็ด ข้าวเปลือกสั้นป้อมยาว 7.4 มิลลิเมตร กว้าง 3.5 มิลลิเมตร และหนา 2.2 มิลลิเมตร ข้าวกล้องสีขาว ยาวเฉลี่ย 5.18 มิลลิเมตร มีท้องไขปานกลาง การร่วงของเมล็ดชากมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120 วัน และให้ผลผลิตประมาณ 700 กิโลกรัมต่อไร่

ลักษณะเด่น

- ให้ผลผลิตสูงในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์
- สามารถปรับตัวได้ดีในพื้นที่ดินนาเขตภาคเหนือตอนบน ภาคเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน
- ทนทานต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีกว่าข้าวญี่ปุ่นพันธุ์อื่นๆ
- คุณภาพการสีดี ได้ขาวเต็มเมล็ดและต้นข้าวประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์
- คุณภาพการหุงต้ม และรับประทานดีตรงตามมาตรฐาน

การถ่ายยีนในข้าว

วิชัย (2538) ได้กล่าวถึงการถ่ายยีนให้กับเซลล์พืชไว้ว่า การส่งถ่ายยีนจากภายนอกเข้าสู่ เซลล์พืชนั้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งอาจทำให้พืชนั้น แสดงลักษณะของยีนที่ต้องการได้ ต้นพืชที่มียีนจากแหล่งอื่นสอดแทรกเข้าไปอยู่ในจีโนม และ แสดงลักษณะของยีนนั้นออกมาได้เรียกว่า พืชจำลองพันธุ์ (Transgenic plant) กระบวนการส่งถ่าย ยีนแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการใหญ่ๆ คือ

การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง (direct gene transfer) เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช โดยไม่มีพาหะเป็นตัวนำ เช่น การใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG) การใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การฉีดเข้าเซลล์ (microinjection) การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) สำหรับการใส่สารเคมี PEG และกระแสไฟฟ้า นั้น เซลล์เป้าหมายที่จะรับยีนหรือ

ดีเอ็นเอส่วนใหญ่เป็นโปรโตพลาสต์ ดังมีรายงานที่ประสบความสำเร็จของการใช้สารเคมี PEG ในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าวอินดิกา (Peng, *et al.*, 1992; Datta, *et al.*, 1992) และข้าวจาปอนิกาเท่านั้น (Uchimiya, *et al.*, 1986; Zhang, and Wu, 1988) นอกจากนี้ PEG ยังสามารถนำมาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ส่วนที่แขวนลอยขนาดเล็กของข้าว (Lee, *et al.*, 1991) ได้ด้วย สำหรับการใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าว พบว่ามีรายงานเฉพาะข้าวจาปอนิกาเท่านั้น (Toriyama, *et al.*, 1988; Zhang, *et al.*, 1988; Tada, *et al.*, 1990; Toki, *et al.*, 1992) ในข้าวอินดิกายังไม่มีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ด้วยวิธีนี้ แต่มีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่คัพภะของข้าวพันธุ์ IR36 โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Xu, and Li, 1994) สำหรับข้าวจาปอนิกามีรายงาน การถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนใบของต้นข้าวด้วยกระแสไฟฟ้า (Dekeyser, *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังมีความพยายามปรับเทคนิคทั้ง 2 วิธีนี้ร่วมกัน คือ ใช้สารเคมี PEG ร่วมกับการใช้กระแสไฟฟ้า ในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าว Taipei 309 (Yang, *et al.*, 1998)

การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยใช้พาหะ (vector mediated gene transfer) เป็นวิธีที่ใช้พาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช พาหะที่ได้รับการพัฒนาจนประสบความสำเร็จและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ที่เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งมี Ti plasmid เป็นพาหะส่งถ่ายยีนที่เราต้องการ ไปเชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอในโครโมโซมของพืชสามารถทำได้ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และมีประสิทธิภาพสูงแต่มีข้อจำกัดคือ ได้ผลดีเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น เนื่องจากในธรรมชาติเชืชนิดนี้จะไม่เข้าไปทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Hooykaas-Van Slogteren, 1984) มีความพยายามถ่ายยีนในข้าวด้วย *A. tumefaciens* โดยปรับปรุงวิธีการต่างๆ รวมทั้งสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ สภาพแวดล้อมของการถ่ายยีน มีรายงานความสำเร็จในการถ่ายยีนข้าวโดยใช้ *A. tumefaciens* ทั้งในข้าวจาปอนิกา (Raineri, *et al.*, 1990; Li, *et al.*, 1992; Hiei, *et al.*, 1994) และข้าวอินดิกา (Chan, *et al.*, 1992; Chan, *et al.*, 1993; Xu, *et al.*, 1993) แต่ยังคงอยู่ในวงจำกัด

การฝากถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*

Agrobacterium เป็นจุลินทรีย์ดินในสกุล *Rhizobiaceae* ขัอมดิสแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ไม่สามารถตรึงในโครเจนจากอากาศได้ เป็นเชื้อที่อยู่ในดินอย่างอิสระหรืออยู่ในน้ำ เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลล่า ไม่สร้างสปอร์ เมื่อเจริญบนอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ จะสร้างเมือกที่เป็นน้ำตาลแข็งข้นขึ้นรอบๆ เซลล์ โคโลนีไม่มีสี ผิวเรียบ บางสายพันธุ์โคโลนีมีผิวขรุขระ ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ซึ่งมีออกซิเจนน้อย เช่นในเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 25-30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-9.0 เป็นเชื้อ ที่ทำให้เกิดโรคกับพืช โดยทำให้

การเจริญของเซลล์ cortex ของพืชอย่างรวดเร็ว เรียกว่า cortical hypertrophies พืชหลายชนิดเมื่อได้รับเชื้อมักจะเกิดโรครูปุ่มปม (crown gall tumor) บนรากและลำต้น (ไพโรจน์, 2526) และจะสามารถแยกแบคทีเรียออกมาได้จากปุ่มปมเหล่านี้แล้วจำแนกโดยเพาะเชื้อเข้าไปในพืชทดลอง (Veldstra, 1972)

บาซาน และจิบบอน (Bachanan, and Gibbons 1974) ได้จำแนกสกุล *Agrobacterium* ออกเป็นชนิด โดยอาศัยลักษณะที่สำคัญดังนี้

ก. ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และกลีโคแอมโมเนียเป็นแหล่งสร้าง 3-ketolactose

(1.) ทำให้เกิดปุ่มปม (*Agrobacterium tumefaciens*) *A. tumefaciens*

(2.) ไม่ทำให้เกิดปุ่มปม *A. radiobacter*

ข. ไม่ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และกลีโคแอมโมเนียเป็นแหล่งสร้าง 3-ketolactose

(1.) ทำให้เกิดรากฝอย *A. rhizogenes*

(2.) ทำให้เกิดปุ่มปมบนรากเบอร์รี่ *A. rubi*

พลาสมิดใน *A. tumefaciens*

A. tumefaciens มีพลาสมิดขนาด 140-235 kilobases เรียกว่า Tumor-inducing หรือ Ti plasmid ตามลักษณะซึ่งสามารถทำให้พืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดเกิด crown gall tumor คือพืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม และเนื้อเยื่อพืชเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อได้รับเชื้อผ่านบาดแผลบนต้นพืช (Willmitzer, et. al., 1982) แบคทีเรียไม่สามารถทำให้เกิดปุ่มปมในพืชที่ไม่มีบาดแผล และการเกิดปุ่มปมกับพืชจะขัดขวางการเจริญเติบโตของพืช หรือทำให้พืชตายเพราะจะไปรบกวนการหมุนเวียนของน้ำและอาหารในพืช (Hooykaas, and Schilperoort, 1984) เมื่อนำเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในอาหารปราศจากเชื้อ จะไม่พบแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค แต่เซลล์ที่เปลี่ยนแปลง (transformed cell) ที่เกิดขึ้นจะมีการพัฒนาเป็นแคลลัส (เนื้อเยื่อพืชที่ยังไม่พัฒนาเป็นต้นหรือราก) หรือ teratoma (เนื้อเยื่อที่สามารถพัฒนาเป็นยอดอ่อนๆ และลำต้นเห็นได้ชัด) โดยการเจริญเติบโตของพืชไม่จำเป็นต้องเติม auxin and cytokinin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเนื้อเยื่อปกติ (Willmitzer, et. al., 1982; Caplan, et. al., 1983)

ส่วนหนึ่งของ Ti plasmid คือ T-DNA (transferred DNA) จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เกิดเซลล์ที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งต่อมาทำให้เกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นปุ่มปม ยีนในส่วน T-DNA มีบทบาทสำคัญในการทำให้พืชสร้าง opine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน opine มี 2 ชนิดคือ octopine และ nopaline (Owens, 1982) นอกจากนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้าง agropine ซึ่งเพิ่งค้นพบใหม่ (Petit, et. al., 1983) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง

กรดอะมิโนคือ octopine dehydrogenase หรือ nopaline dehydrogenase ซึ่งถูกกำหนดโดยยีนบนส่วน T-DNA (Schrimsher, and Taylor, 1982; Montoya, *et. al.*, 1977)

ชนิดของ opine ที่สร้างขึ้นในปมปม จะถูกกำหนดโดยสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สามารถนำ opine ที่สร้างขึ้นไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนโดยอาศัย catabolic gene บน Ti plasmid สร้างเอนไซม์สำหรับย่อยสลาย opine (Panagoponlos, and Psallidas, 1973). T-DNA มียีนควบคุมการสร้างฮอร์โมน ซึ่งมีผลกระทบทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวและเจริญได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดปมปม (Amasino, and Miller, 1982)

กลไกการถ่ายทอดยีนของ *A. tumefaciens*

การศึกษากลไกการทำงานของเชื้อ *Agrobacterium* นี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเกี่ยวกับ *A. tumefaciens* (Ohshima, *et. al.*, 1979) พบว่า หลังจากที่มีการปลูกเชื้อบนชิ้นส่วนพืชแล้ว ระยะเวลาที่แบคทีเรียเชื่อมติดกับเซลล์พืช ใช้เวลาประมาณ 20-60 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เนื้อเยื่อพืชและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเชื่อมติดไม่ต้องการ Ca^{2+} และถ้าจะมีการยับยั้งการเชื่อมติดอีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสม คือ 6 การใช้แบคทีเรียมีจำนวนเซลล์มากในการปลูกเชื้อบนเซลล์พืช เพื่อให้แบคทีเรียมีการสังเคราะห์เส้นใยเซลล์ulos อย่างรวดเร็ว และเกิดแบคทีเรียกลุ่มใหญ่จำนวนมาก พืชใบเลี้ยงเดี่ยว ไม่เกิดโรคจากเชื้อ *A. tumefaciens* เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถยึดเกาะกับผนังเซลล์พืชได้ เมื่อพลาสมิดถูกเคลื่อนย้ายจากแบคทีเรียไปสู่เซลล์พืช จะเข้าร่วมกับโครโมโซมของพืช กลไกการชักนำให้เกิดปมปมระดับโมเลกุล มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Matthysse, *et. al.*, 1981; Chilton, 1983) เพื่อหาทางนำ Ti plasmid มาใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดยีนมีประโยชน์ให้แก่พืชต่อไป (ธนสุรา, 2530)

ยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reporter gene) มีข้อแตกต่างกันคือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการ ที่ทำให้คัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ที่ได้รับยีนที่ถ่ายฝากลงไปได้ง่ายๆ เพื่อตรวจสอบผลสำเร็จของการฝากถ่ายยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบว่า ส่วนของโปรโมเตอร์ที่คู่กับยีนนั้น มีการแสดงออกหรือไม่ และแสดงออกมากน้อยเพียงใด ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใด ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืชนั้น อาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะอยู่คู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบแล้วทำงานได้ตลอดเวลาและในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผลก็จะอยู่คู่กับส่วนของ DNA ที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์ โปรโมเตอร์สำหรับการแสดงออกของยีนในพืชที่ใช้กันมาก คือ โปรโมเตอร์จากยีน nopaline synthase (nos promoter)

ซึ่งอยู่ในส่วนของ T-DNA ของพลาสมิด Ti และโปรโมเตอร์จากไวรัสของกะหล่ำ cauliflower mosaic virus (CaMV35S promoter) หรือโปรโมเตอร์ที่มาจากพืชที่ต้องการทดสอบ

ข้อควรคำนึงถึงในการใช้เวกเตอร์เพื่อถ่ายฝากยีนในพืช คือ ยีนที่จะถ่ายเข้าไปต้องควบคุมโดยโปรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ในเซลล์ของพืช เวกเตอร์ที่นิยมใช้พลาสมิดที่มีส่วนของ DNA ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลใน *E.coli* อยู่ด้วยเพื่อใช้เพิ่มปริมาณการใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายฝากยีน เวกเตอร์ที่ใช้ต้องมีส่วนของ RB และ LB ของ T-DNA หรือมีส่วนที่เหมือนกับส่วนที่ใส่ไว้ในพลาสมิด Ti ของ *Agrobacterium* (สุรินทร์, 2536)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยูราชิบาร่า และคณะ (Urashibara, et. al., 2001) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการย้ายยีนของการเพาะเลี้ยงข้าวในอาหารเหลวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการย้ายยีนในข้าวอินดิกาโดยใช้เวกเตอร์แบบ binary และ superbinary ปัจจุบันนี้มีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียในการย้ายยีนอย่างกว้างขวาง ซึ่งการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียนี้จะให้ประสิทธิภาพสูง อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมี superbinary vector ให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ binary vector (pCambia1301) โดยทั้งสองกรณีสามารถผลิตพืชที่ต้านทานไฮโกรไมซินได้ถึง 60 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดสอบกัส (gus) เป็นบวกถึง 59 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายยีนจึงมีการใช้อะซิโตไซลิงโกน (ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์)

บาลโคนี และคณะ (Balconi, et. al., 1998) ได้ทำการศึกษาการย้ายยีนในข้าวโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยการเพาะเลี้ยงแบบอิตาเลียนพบว่าสายพันธุ์ของ *Agrobacterium* sp. และชนิดของยีนในแคลลัสข้าวมีผลต่อเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์

ไฮอิ และคณะ (Hiei, et. al., 1994) ได้ทำการทดลองถ่ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวพวก จาปอนิกา 3 สายพันธุ์ คือ Tsukinohikari Asanohikari และ Koshihikari โดยศึกษาถึงผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวกเตอร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช คือการเลี้ยงในอาหารที่มีอะซิโตไซลิงโกน ที่อุณหภูมิประมาณ 22 องศาเซลเซียส ถึง 28 องศาเซลเซียส หากเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอะซิโตไซลิงโกนหรือการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าช่วงดังกล่าว จะทำให้การถ่ายยีนไม่ประสบผลสำเร็จ จากการเปรียบเทียบชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีน (ปลายยอด รากของต้นอ่อน สควเทลาตาพืชที่ยังไม่เจริญเต็มที่ แคลลัสที่เจริญมารากอ่อน แคลลัสที่เจริญมาจาก

สควิเทลลา เซลล์แขวนลอยที่ชักนำมาจากสควิเทลลา) โดยดูจากการแสดงออกของยีน GUS พบว่า แคลลัสที่เจริญมาจากสควิเทลลามีการแสดงออกของยีน GUS มากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ แสดงว่าการถ่ายยีนไปที่แคลลัสนี้ ทำง่ายกว่าการถ่ายยีนไปยังส่วนอื่นๆ แคลลัสที่เจริญมาจากสควิเทลลาจึงเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้ในการถ่ายยีนต่อไป ปัจจัยสุดท้ายที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน คือ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และเวกเตอร์ที่ใช้ โดยทั่วไป *Agrobacterium* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ สายพันธุ์ธรรมดา (ordinary stain) เช่น LBA4404 และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการบุกรุกพืช (super virulent stain) เช่น EHA101 นอกจากนี้เวกเตอร์ที่ใช้อย่างแบ่งเป็น binary เวกเตอร์ เช่น pIG 121Hm ซึ่งพัฒนามาจาก pBIN19 และ super binary เวกเตอร์ เช่น pTOK162 จากการทดลองพบว่า การถ่ายยีนในข้าว Tsukinohikari และ Koshihikari โดยใช้ *Agrobacterium* พันธุ์ LBA4404 (pTOK162) จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ *Agrobacterium* พันธุ์ LBA4404 (pIG121Hm) และ EHA 101 (pIG121Hm) ส่วนพันธุ์ EHA101 (pTOK223) จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำมาก

ชาน และคณะ (Chan, *et. al.*, 1992) ได้ทำการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวพวกอินดิคาสายพันธุ์ Taichung Native 1 โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีน และผลของเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่ง (PSC) ในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ที่มีประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยทำการถ่ายยีนไปที่ใบ ลำต้น และรากของต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุประมาณ 3-4 วัน และคัดเลือกแคลลัสที่มีการเปลี่ยนสภาพ โดยเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่ปฏิชีวนะ G418 พบว่ามีเพียงแคลลัสที่เจริญจากรากที่เลี้ยงในอาหารที่มี PSC เท่านั้นที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะ G418 อื่นๆ เป็นแคลลัสที่ไม่สามารถเปลี่ยนสภาพ ซึ่งไม่สามารถต้านยาปฏิชีวนะ G418 ซึ่งแคลลัสพวกนี้จะตายเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ G418 นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อแล้ว อายุของชิ้นส่วนก็มีความสำคัญเช่นกัน พบว่าต้นอ่อนของข้าวที่มีอายุประมาณ 3-4 วัน เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการฝากถ่ายยีน สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* ที่เกิด mutation บริเวณยีน *vir* หรือ *Agrobacterium* ที่มีส่วนของ T-DNA ไปที่รากของต้นอ่อน พบว่าไม่มีแคลลัสที่มีการเปลี่ยนสภาพเกิดขึ้นเลย จึงเป็นการยืนยันว่า ยีน *vir* และส่วนของ T-DNA มีความสำคัญมากต่อการถ่ายยีน จากการศึกษาเกี่ยวกับเวกเตอร์พบว่า การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ที่มีเวกเตอร์แบบ cointegrete เช่น C58C1 (P_gv2260:NG1) จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าเมื่อใช้ *Agrobacterium* ที่มีเวกเตอร์แบบ binary เช่น pBI 121 การเติมสารประกอบฟีนอลิก เช่น อะซิโดไซลิ่งโกน ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง จะไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน *vir* เป็นผลให้ไปเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน การเติม PSC ลงไปในอาหารจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเช่นกัน เนื่องจากใน PSC มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงแต่ PSC ไม่มีผลใดๆ กับรากที่มีอายุมากกว่า 3-4 วัน

ลี และคณะ (Li, *et. al.*, 1992) ได้ทำการศึกษาดังปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *gusA* โดยทำการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ต่างๆ ไปที่ยอด ราก และเมล็ด ที่ได้มาจาก ดันอ่อนของข้าวที่มีอายุ 4 วัน ซึ่งเจริญมาจากเมล็ดหรือคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ตรวจวัดการ แสดงออกของ *gus* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีฟ้าขึ้นที่ชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชที่ถ่ายยีนโดย ใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ At563 (มี pKIWI105 ซึ่งเป็นเวกเตอร์แบบ binary แต่ไม่มีพลาสมิด Ti) สายพันธุ์ At643 (มี pBIN19 ซึ่งเป็นเวกเตอร์แบบ binary แต่ไม่มียีน *gusA*) จะไม่มีการแสดงออก ของ GUS หรือไม่มีจุดสีฟ้าเกิดขึ้นเลย การแสดงออกของ *gus* ในชิ้นส่วนที่ได้จากดันอ่อนที่มาจาก เมล็ด ไม่มีความแตกต่างจากชิ้นส่วนที่ได้จากดันอ่อน ที่มาจากคัพภะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ จากการ ทดลองพบว่า 2,4-D ที่มีในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงดันอ่อน (ระยะที่เมล็ดกำลังจะงอก) จะมีผลไป ยับยั้งการแสดงออกของ *gus* แต่การเติม 2,4-D 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับชิ้นส่วนพืชจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของ *gus* จากการทดลอง ถ่ายฝากยีนในข้าว 3 พวก คือ อินдика จาปอนิกา และกลาเบอริมา รวมทั้งสิ้น 21 สายพันธุ์ พบว่าข้าว อินдикаจะมีการแสดงออกของ *gus* มากที่สุด ซึ่งมากกว่าจาปอนิกาและกลาเบอริมา ถึง 2-3 เท่า ข้าว ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti ชนิดอะโกรปีน จะมีการแสดงออกของ *gus* (เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีฟ้า) สูงถึง 32 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด Ti ชนิดนอพพาลินและออกโทปีน ซึ่งมีการแสดงออกเพียง 16 เปอร์เซ็นต์ และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชิ้นส่วนพืชที่มีการถ่ายยีนโดยใช้ pBIN19 เป็นเวกเตอร์ จะมีการ แสดงออกของ *gus* มากกว่าเมื่อใช้ pEND4K เป็นเวกเตอร์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AG204
2. เตาอบไมโครเวฟ (microwave) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG2002-S
3. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MP 220
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator) ยี่ห้อ Forma Scientific รุ่น 420
5. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich รุ่น D-78532
6. ตู้เพาะเมล็ดพืช (plant growth chamber) ยี่ห้อ Contherm
7. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow biohazard cabinet) ยี่ห้อ Telstar รุ่น AV-100
8. ชุดแยกสารพันธุกรรมโดยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis system)
9. ตู้แช่แข็ง (refrigerated -40°C) ยี่ห้อ Forma Scientific
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไฟฟ้า (autoclave electrical) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
11. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Shimadzu uv-1601
12. เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document system) ยี่ห้อ
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ยี่ห้อ รุ่น
14. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (hot plate stirrer) ยี่ห้อ รุ่น
15. ไมโครปิเปต ขนาด 10, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

สารเคมี

1. Yeast extract บริษัท DIFCO
2. Agar บริษัท DIFCO
3. K_2HPO_4 บริษัท Aja เกรด AR 99 %
4. NaH_2PO_4 บริษัท Ajax เกรด AR 99 %
5. NH_4Cl บริษัท Aja เกรด AR 99.5%
6. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Aja เกรด AR 98 %
7. KCl บริษัท Aja เกรด AR 99.8%
8. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Aja เกรด AR 98 %

9. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Carlo Erba Reagenti เกรด AR 95.5%
10. Glucose บริษัท Riedel- dehaen เกรด AR 99 %
11. 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid บริษัท Fluka เกรด AR 90 %
12. 6-Benzylaminopurine บริษัท Sigma เกรด AR 99.8%
13. Acetosyringone บริษัท Sigma เกรด AR 99.5%
14. H_3BO_3 บริษัท Merck เกรด AR 99.8%
15. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Suharluu Chemie เกรด AR 98 %
16. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Aja เกรด AR 99 %
17. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Aja เกรด AR 99 %
18. KI บริษัท Aja เกรด AR 99 %
19. Myo-Inositol บริษัท Sigma เกรด AR 99 %
20. Nicotin acid บริษัท Sigma เกรด AR 99.7%
21. Pridoxin HCl บริษัท Sigma เกรด AR 99.5%
22. Thiamin HCl บริษัท Sigma เกรด AR 99.5%
23. L-Glycine บริษัท Fluka เกรด AR 99 %
24. L-Arginine บริษัท Fluka เกรด AR 99.5%
25. L-Glutamine บริษัท Fluka เกรด AR 99 %
26. Casmmino acid บริษัท Sigma เกรด AR 99 %
27. Sucrose บริษัท Aja เกรด AR 99 %
28. KNO_3 บริษัท AjaS เกรด AR 99 %
29. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ บริษัท Ajax เกรด AR 99 %
30. $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Aja เกรด AR 98 %
31. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Ajax เกรด AR 99 %
32. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ บริษัท Aja เกรด AR 99 %
33. Casein hydrolysate บริษัท Fluka เกรด AR 99 %
34. L-Proline บริษัท Fluka เกรด AR 99 %
35. KH_2PO_4 บริษัท Aja เกรด AR 99 %
36. Cefotaxime บริษัท Sigma เกรด AR 99 %
37. Hygromycin (H_m) บริษัท Sigma เกรด AR 99 %
38. Kanamycine (K_m) บริษัท Sigma เกรด AR 99 %

39. Vancomycin บริษัท Sigma เกรด AR 99 %

40. CL-XPosure™ Film ขนาด 12.5X17.5 cm ยี่ห้อ PIERCE

41. 0.45 µm Biodyne B Pre-Cut Modified Nylon Membranes ขนาด 8X12 cm ยี่ห้อ PIERCE

42. ชุดตรวจจับ Northern blot และ Southern (North2South Direct HRP Labeling and Detection Kit) ยี่ห้อ PIERCE

43. น้ำยา developer and replenisher ยี่ห้อ Kodak

44. น้ำยา fixer and replenisher ยี่ห้อ Kodak

45. HyperLadder I DNA maker บริษัท BIOLINE

46. Agarose gel บริษัท Promega

47. Acrylamide gel บริษัท Amersham Pharmacia Biotech

48. *N,N',N'',N'''*-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech

49. Sodium dodecyl sulfate (SDS) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech

50. Triton X-100 บริษัท Amersham Pharmacia Biotech

51. Lysozyme บริษัท Amersham Pharmacia Biotech

52. *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Sac* I และ *Xho* I บริษัท New England Biolabs

53. เอนไซม์ T4 DNA ligase บริษัท Promega

54. เอนไซม์ Taq polymerase บริษัท Promega

55. Bacteriological peptone บริษัท Fluka

56. Diethyl pyrocarbonate, ethidium bromide (EtBr) บริษัท Fluka

57. Ampicillin บริษัท Merck

58. ข้าวคอกมะลิ 105

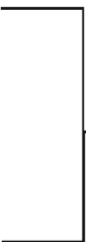
59. ข้าวโกชิการิ

วิธีการวิจัย

1. สร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มีอินโคติเนสจากกระถินบ้าน

1.1 นำพลาสมิด pUC19 ที่มีอินโคติเนสจากกระถินบ้านมาหาลำดับเบส (sequencing) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

1.2 นำพลาสมิด pUC19 ที่มียีนไคติเนสจากกระถินบ้านมา 1 μ l (50 μ g) ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 1,100 bp

Plasmid DNA	5 μ l (100 μ g)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l		
H ₂ O	3 μ l		
<i>Bam</i> HI	0.5 μ l		
<i>Sac</i> I	0.5 μ l		
Total	10 μl		

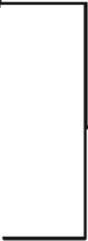
1.3 นำพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 6,150 bp

1.4 นำพลาสมิด pBI121 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I มาเชื่อมต่อกับ DNA fragment ของไคติเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I โดยใช้เอนไซม์ T₄ DNA ligase บ่มที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight

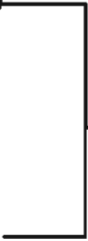
Plasmid pBI121	1 μ l		Incubate at 4°C overnight
DNA fragment	5 μ l		
10Xbuffer ligase	1 μ l		
H ₂ O	2.5 μ l		
T4 DNA ligase	0.5 μ l		
Total	10 μl		

1.5 นำ recombinant DNA ที่ได้ไป transform เข้าสู่ *E.coli* DH5 α บนอาหาร LB plate ที่มี kanamycin 50 mg/L เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้โคโลนีเกิดขึ้น

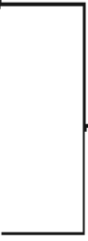
1.6 นำโคโลนีมาตรวจหายีนไคติเนสในพลาสมิด pBI121 โดยสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I จะต้องมีแบนด์ขนาดประมาณ 1,100 bp ของ ยีนไคติเนส และแบนด์ขนาดประมาณ 6,150 bp ของพลาสมิด pBI121

Plasmid DNA	5 μ l (100 μ g)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l		
H ₂ O	3 μ l		
<i>Bam</i> H I	0.5 μ l		
<i>Sac</i> I	0.5 μ l		
Total	10 μl		

1.7 นำพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นโคติเนสมาดัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 2,206 bp ที่มี promoter CaMV35S ขนาด 870 bp ชิ้นโคติเนสขนาด 1,065 bp และ NOS ขนาด 271 bp

Plasmid DNA	5 μ l (100 μ g)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l		
H ₂ O	3 μ l		
<i>Hind</i> III	0.5 μ l		
<i>Eco</i> RI	0.5 μ l		
Total	10 μl		

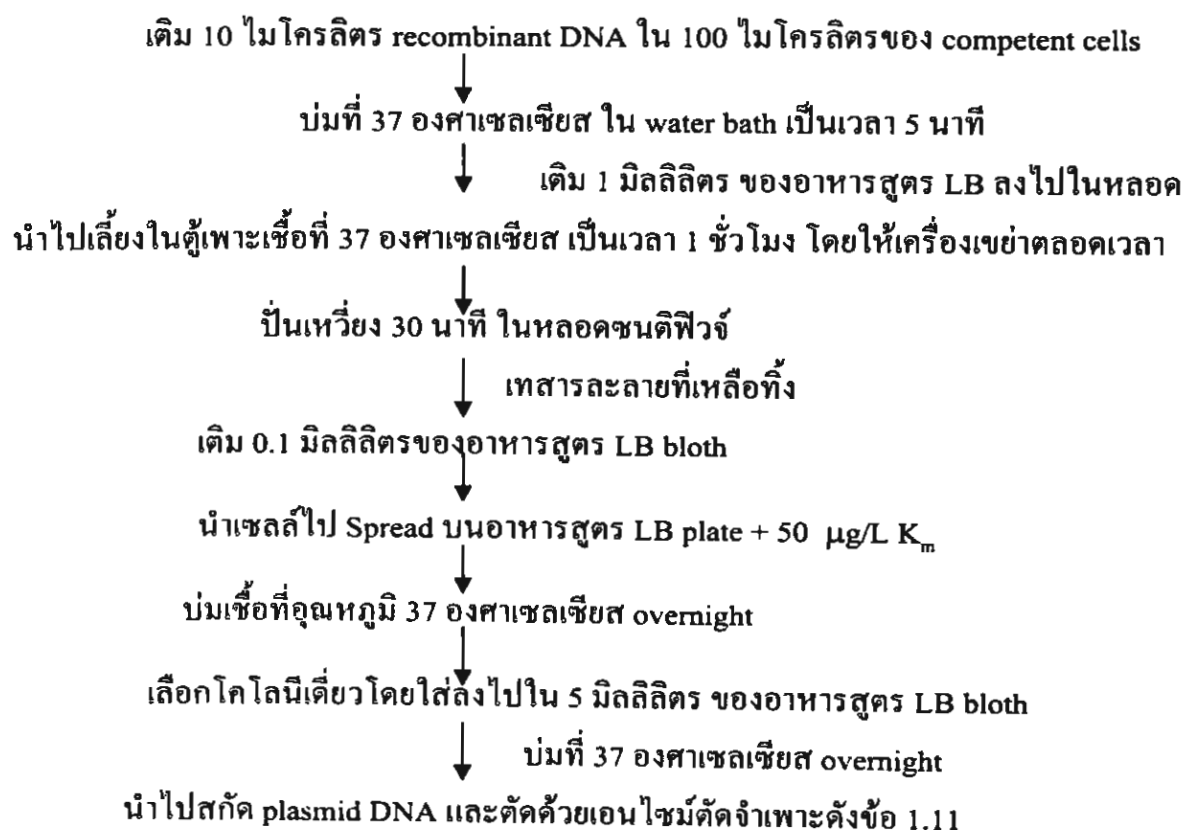
1.8 นำพลาสมิด pCAMBIA 1300 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 8,958 bp

Plasmid 1300	5 μ l (100 μ g)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l		
H ₂ O	3 μ l		
<i>Hind</i> III	0.5 μ l		
<i>Eco</i> RI	0.5 μ l		
Total			10 μl

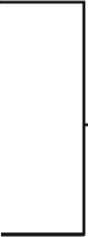
1.9 นำพลาสมิด pCAMBIA1300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI มาเชื่อมต่อกับ DNA fragment ขนาดประมาณ 2,206 bp ที่มี promoter CaMV35S ขนาด 870 bp ยีนไคตินเนส ขนาด 1,065 bp และ NOS ขนาด 271 bp โดยใช้เอนไซม์ T₄ DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight

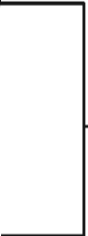
pCAMBIA1300	1 μ l		Incubate at 4°C overnight
DNA fragment	5 μ l		
10Xbuffer ligase	1 μ l		
H ₂ O	2.5 μ l		
T4 DNA ligase	0.5 μ l		
		Total	10 μ l

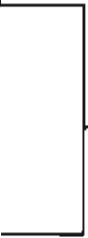
1.10 นำ recombinant DNA ที่ได้ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α บนอาหาร LB plate ที่มี kanamycin 50 mg/L เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้โคโลนีเกิดขึ้น

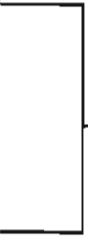


1.11 เลือกโคลนที่ได้มาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI, เอนไซม์ *Hind* III และ *Bam* HI, เอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I, เอนไซม์ *Sac* I และ *Eco* RI, เอนไซม์ *Bam* HI และ *Eco* RI จะได้แบนด์ขนาดประมาณ 2,206 bp ของ promoter CaMV35S + chitinase + NOS แบนด์ขนาด 870 bp ของ promoter CaMV35S, แบนด์ขนาด 1,100 bp ของ chitinase แบนด์ขนาด 271 bp ของ NOS และแบนด์ขนาด 1336 bp ของ chitinase + NOS

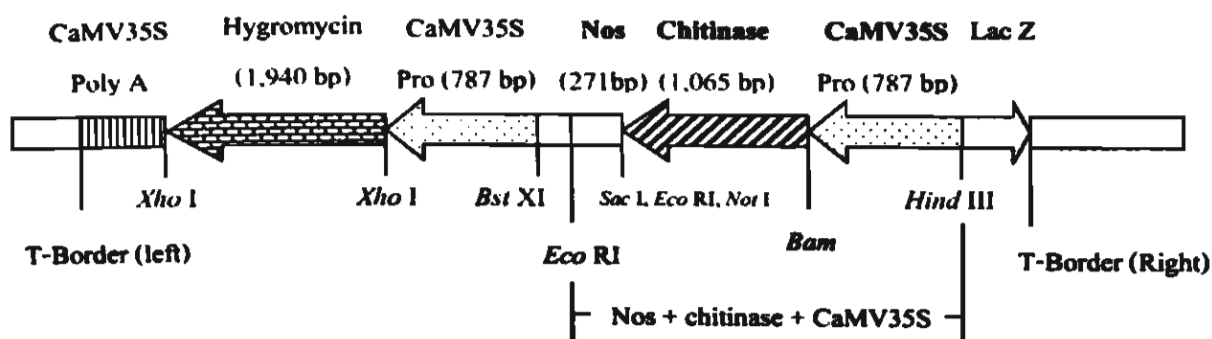
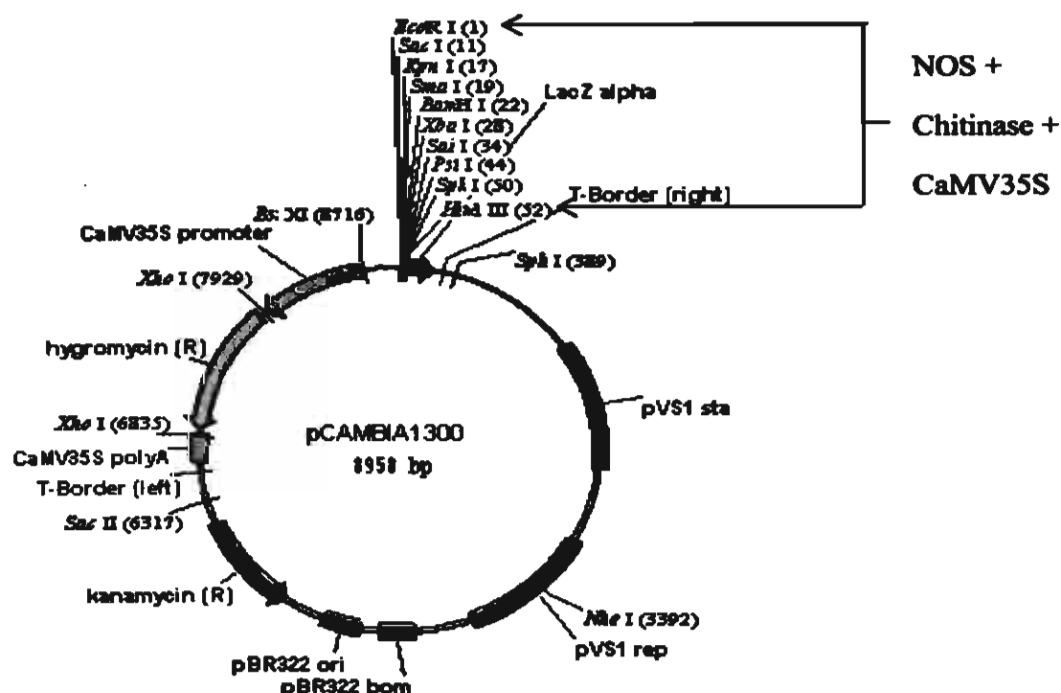
Plasmid 1300	5 µl (100 µg)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 µl		
H ₂ O	3 µl		
<i>Hind</i> III	0.5 µl		
<i>Eco</i> RI	0.5 µl		
Total	10 µl		

Plasmid 1300	5 µl (100 µg)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 µl		
H ₂ O	3 µl		
<i>Hind</i> III	0.5 µl		
<i>Bam</i> HI	0.5 µl		
Total	10 µl		

Plasmid 1300	5 µl (100 µg)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 µl		
H ₂ O	3 µl		
<i>Bam</i> HI	0.5 µl		
<i>Sac</i> I	0.5 µl		
Total	10 µl		

Plasmid 1300	5 µl (100 µg)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 µl		
H ₂ O	3 µl		
<i>Sac</i> I	0.5 µl		
<i>Eco</i> RI	0.5 µl		
Total	10 µl		

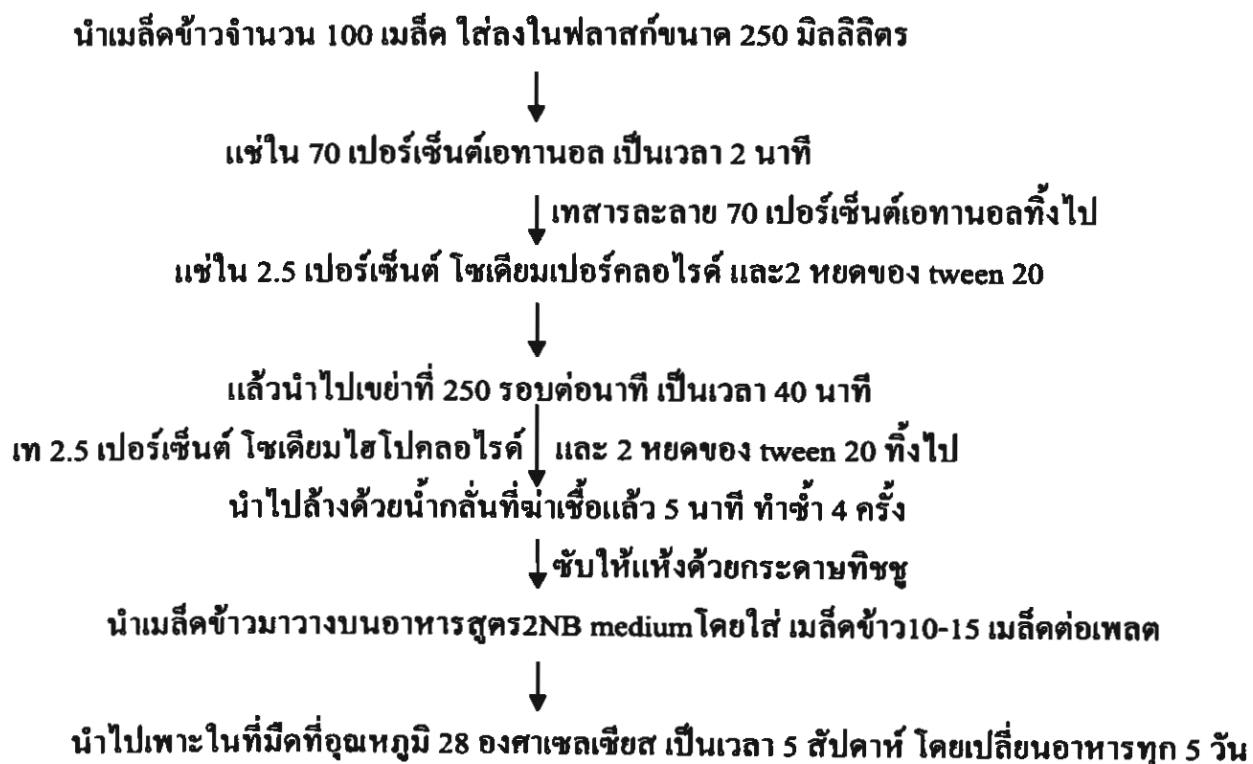
Plasmid 1300	5 μ l (100 μ g)	Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l	
H ₂ O	3 μ l	
<i>Bam</i> HI	0.5 μ l	
<i>Eco</i> RI	0.5 μ l	
Total	10 μl	



ภาพที่ 3.1 การสร้างพลาสมิด pCambia 1300 ที่มียีนไคตินเนส

2. การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดเป็นแคลลัส

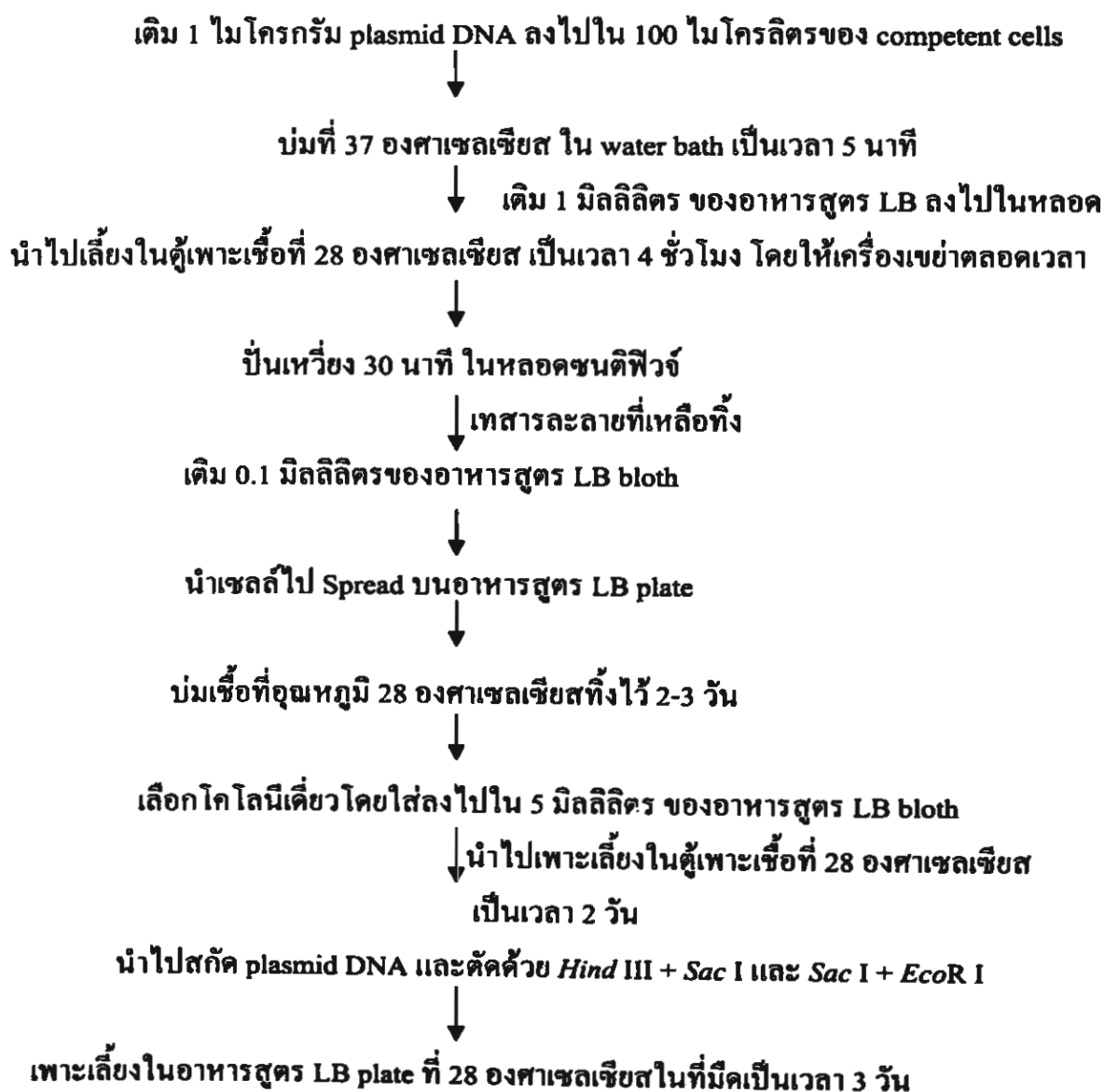
นำเมล็ดข้าวมา 100 เมล็ด ใส่ลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเข้าเป็นเวลา 2 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้งไปเติมน้ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ และเข้าเป็นเวลา 40 นาที แล้วเทโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ทิ้งไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง เทสารละลายทิ้ง นำเมล็ดข้าวมาซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู นำเมล็ดข้าวมาวางบนอาหารสูตร NB medium ที่เติมน้ำ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2,4-D โดยใส่ 10 – 15 เมล็ดต่อ 1 เพลต นำไปเพาะในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แต่หลังจาก 2 สัปดาห์ ให้แยกเอาแคลลัสมาวางบนอาหาร NB medium ที่เตรียมใหม่ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 5 วัน เป็นเวลา 3 ครั้งจนครบ 5 สัปดาห์ ทำซ้ำเช่นนี้ 3 รอบ



3. การ transformed recombinant DNA ที่มียีนไคตินเนสเข้าสู่โกรแบคทีเรีย

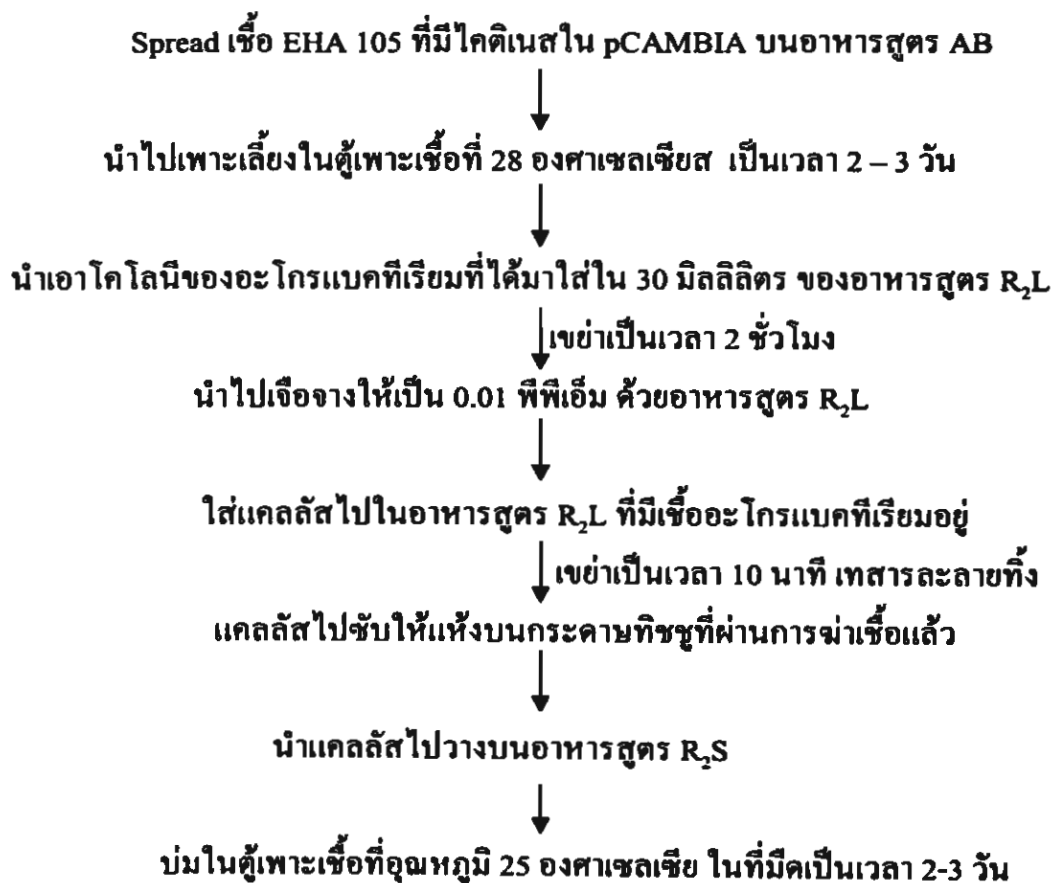
เติม 1 ไมโครกรัม ของพลาสมิดคีเอ็นเอ pCAMBIA 1300 + promoter + chitinase + NOS และ pCAMBIA 1301 ที่มี GUS gene มาใส่ใน 100 ไมโครลิตรของ competent cells จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร ของอาหาร LB broth แล้วนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำ 0.1 มิลลิลิตร ของ LB ในตะกอนที่มี

เซลล์อะโกรแบคทีเรีย นำไป spread บนอาหารสูตร LB plate ที่มี K_m เข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรฟามพิซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ 2-3 วัน เลือกโคโลนีไปตรวจหาฮีนโคติเนส โดยนำโคโลนีเดี่ยวใส่ใน 5 มิลลิลิตร ของอาหารสูตร LB + 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ K_m และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของไรฟามพิซิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สกัดดีเอ็นเอพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I และ *Hind* III + *Eco*R I นำโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียที่มีฮีนโคติเนสไปเลี้ยงในอาหารสูตร LB + 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของกานาไมซิน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 3 วัน (เตรียมถ่ายฮีนโคติเนสเข้าไปในแคลลัสข้าว)



4. การถ่ายยีนโคติเนสเข้าแคลลัสข้าวด้วยอะโกรแบคทีเรีย

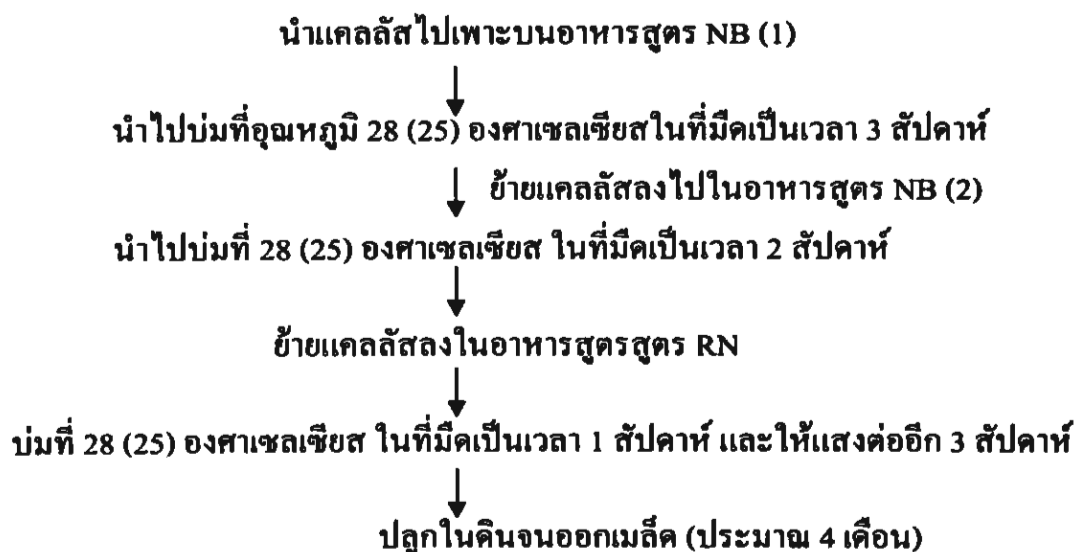
เชื้อเชื้อ EHA 105 + pCAMBIA บนอาหารสูตร AB + 50 มิลลิกรัมต่อลิตร Hm + 50 มิลลิกรัมต่อลิตร Km นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 วัน นำเอาโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียที่ได้มาใส่ใน 30 มิลลิลิตร ของอาหารสูตร R_2L + 50 ไมโครโมลาร์ของอะซิโดไซลิงโกน (ในหลอด 50 มิลลิลิตร) เขย่าเป็นเวลา ประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ค่า OD = 1 หลังจากนั้นนำไปเจือจางให้เป็น 0.01 พีพีเอ็ม ด้วยอาหารสูตร R_2L ($3-5 \times 10^9$ cell/ mL) ใส่แคลลัสไปในอาหารสูตร R_2L ที่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรียอยู่แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วนำแคลลัสไปวางบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้ง นำแคลลัสไปวางบนอาหารสูตร R_2S (R_2 + 50 ไมโครโมลาร์ของอะซิโดไซลิงโกน) นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 2-3 วัน



5. การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น

นำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร R_2S 3 วันแล้ว เปลี่ยนเป็นอาหารสูตร NB(1) + 30 กรัมต่อลิตร ของซูโครส + 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ 2,4-D + 400 มิลลิกรัมต่อลิตรของซีโฟแทกซิม + 7 กรัม agarose gel type I + 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ H₂ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

(ข้าวโกชิอิการิใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ในที่มีดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสลงไปในอาหารสูตร NB (2) + 40 มิลลิกรัมต่อลิตรของ H_m นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (สำหรับข้าวโกชิอิการิใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ในที่มีดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร RN (NB + 30 กรัมต่อลิตรของซูโครส + 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรของ NAA + 3 มิลลิกรัมต่อลิตรของ BAP + 1 มิลลิกรัมต่อลิตรของไคเนติน + 6 กรัมต่อลิตรของไฟตาเจล + 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ H_m) นำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส (ข้าวโกชิอิการิใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ในที่มีดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และให้แสงต่ออีก 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบ ตรวจสอบขึ้นไคตินส และนำไปเพาะต่อในดินจนกระทั่งเจริญเติบโต



6. การตรวจสอบขึ้นไคตินสในแคลลัสและส่วนต่างๆ ของข้าว

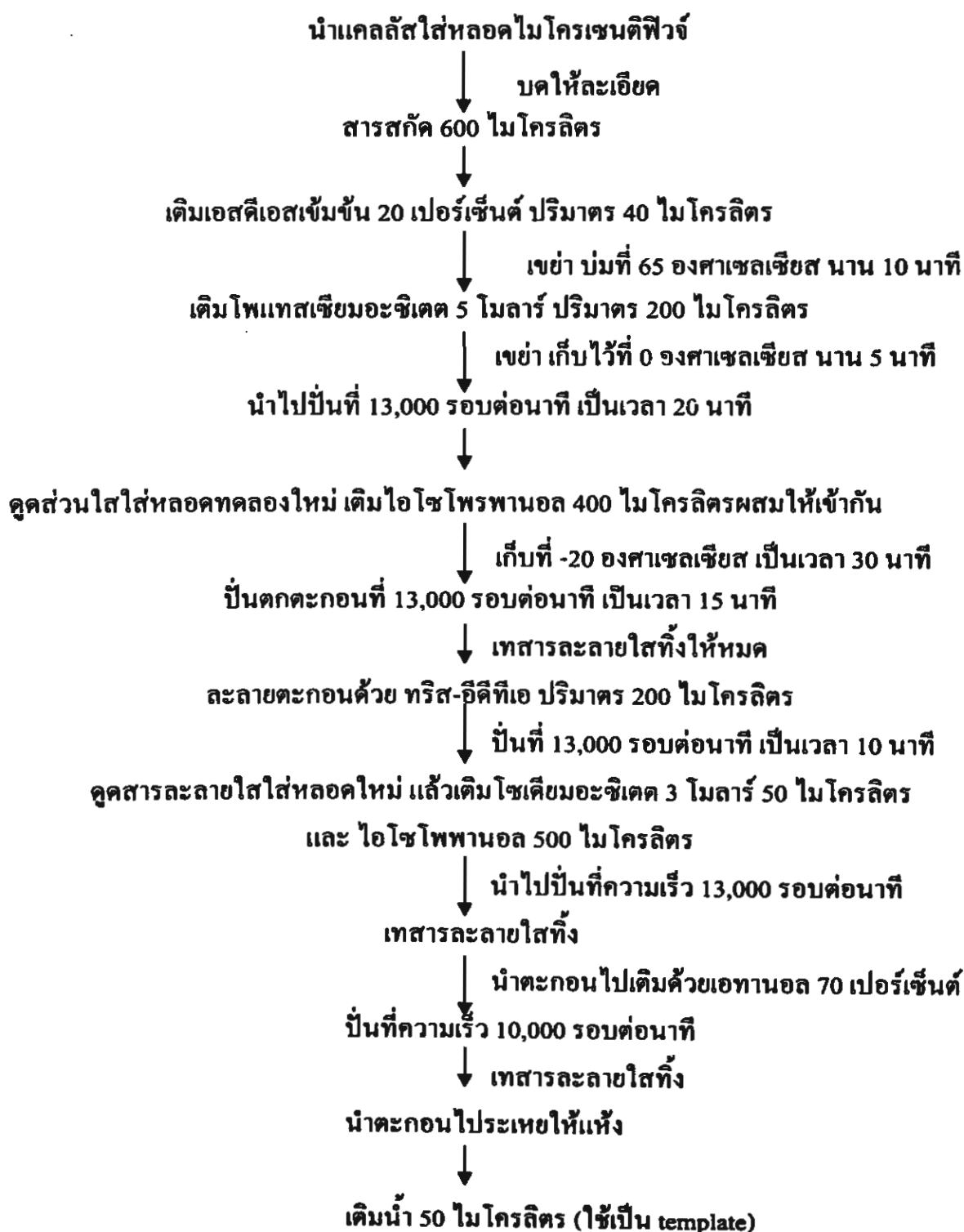
6.1 การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

6.1.1 สกัด DNA จากแคลลัส และส่วนต่าง ๆ ของพืช ราก ต้น ใบ ที่มีอายุ 1 เดือน

2 เดือน 3 เดือน และ 4 เดือน

นำแคลลัสใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เดิมสารสกัด 600 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด เติมเอสดีเอสเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมโพแทสเซียมอะซิเตด 5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารผสมมาปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย ทริส-อีดีทีเอ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ใส่หลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตด 3 โมลาร์ 50 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เทสารละลายใส่ทิ้ง แล้วนำตะกอนไปล้างด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ ทิ้ง นำตะกอนไปประเหยให้แห้ง



6.1.2 การทำ PCR

ผสมสารในหลอดทดลอง 0.2 มิลลิลิตร ดังตารางโดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากแต่ละส่วนของพืชเป็น template และมีลำดับเบส ATCAAATCCAAGAGATGG เป็น forward primer และมีลำดับเบส CTCGAGGAGGACGTCGATGAG เป็น reverse primer

ลำดับ	สาร	ความเข้มข้น	จำนวน
1.	template DNA	100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
2.	buffer	10 เท่า	2.5 ไมโครลิตร
3.	dNTP	2 มิลลิโมล	2.5 ไมโครลิตร
4.	primer Forward	50 พิโกโมล	1 ไมโครลิตร
5.	primer Reward	50 พิโกโมล	1 ไมโครลิตร
6.	Tag DNA polymerase	5 ยูนิตต่อไมโครโมล	0.5 ไมโครลิตร
7.	MgCl ₂	1.5 มิลลิโมล	1.5 ไมโครลิตร
8.	H ₂ O	-	15.5 ไมโครลิตร

นำหลอดของสารผสมไปเข้าเครื่อง PCR ตั้งสภาวะการเพิ่มปริมาณดังนี้

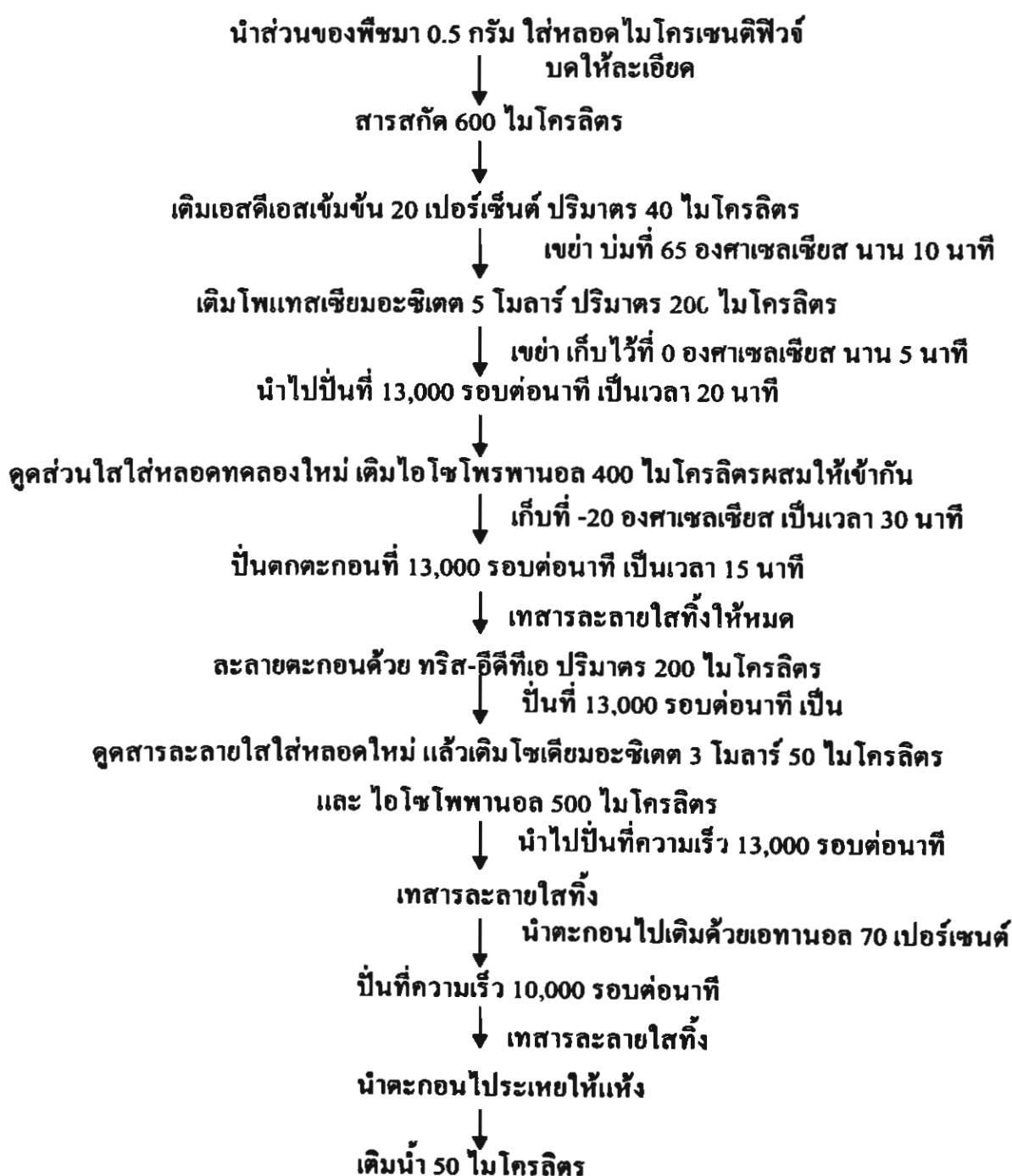
1. ให้ความร้อน 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
 2. ให้ความร้อน 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 3. ให้ความร้อน 55 องศาเซลเซียส 1 นาที
 4. ให้ความร้อน 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 5. ให้ความร้อน 72 องศาเซลเซียส 7 นาที
 6. บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
-

6.2 การทำ Southern blot

6.2.1 สกัด DNA จากแคลลัส และส่วนต่าง ๆ ของพืช ราก ต้น ใบ ที่มีอายุ 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน และ 4 เดือน

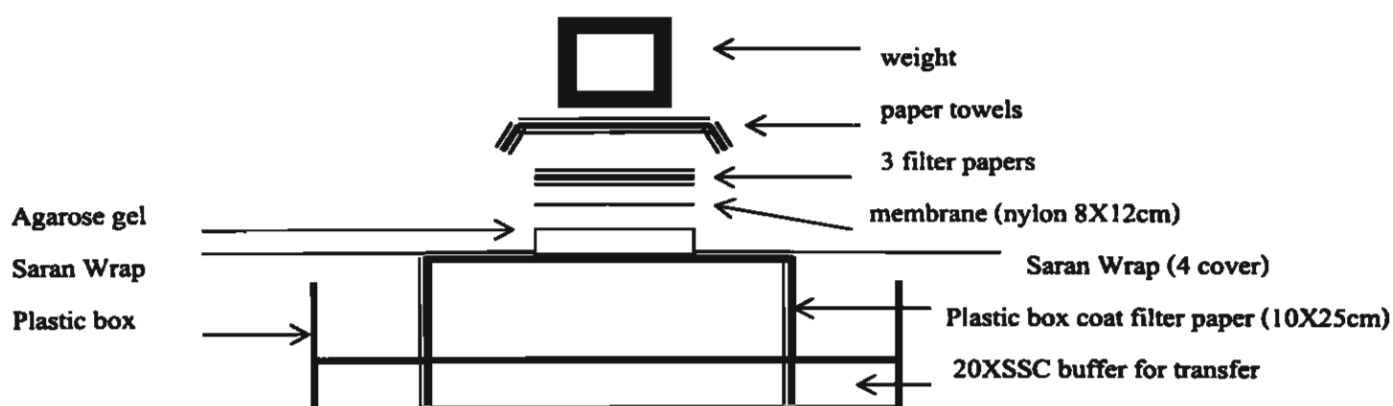
นำส่วนต่างๆ ของพืชมา 0.5 กรัม ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมน้ำสกัด 600 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด เติมนิวคลีเอสเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมนิวคลีเอสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติมนิวคลีเอสไพโรฟานอล 400 ไมโครลิตร ผสม

ให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารผสมมาปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายใส่ทิ้ง ละลายตะกอนด้วย ทริส-ฮิดีทีเอ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตด 3 โมลาร์ 50 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่น ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เทสารละลายใส่ทิ้ง แล้วนำตะกอนไปล้างด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใส่ ทิ้ง นำตะกอนไประเหยให้แห้ง



6.2.2 ถ่าย chitinase DNA ไปบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส

นำ chitinase DNA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม) run บน agarose electrophoresis 1.2% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสารละลาย TAE buffer แฉะเจลในสารละลาย denaturizing (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) เป็นเวลา 60 นาที และนำไปแช่ในสารละลาย Neutralizing (1 M Tris-HCl pH8.0, 1.5 M NaCl) เป็นเวลา 60 นาที แฉะแผ่น Nylon membrane ในน้ำ 5 นาที แล้วย้ายไปแช่ใน 20XSSC เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปวางบนกระดาษกรองที่จุ่มในสารละลาย 20XSSC แล้ววางแผ่น Nylon membrane ทับลงไปแล้วตามด้วยกระดาษกรอง 3 แผ่น กระดาษ towels และวางทับด้วยน้ำหนัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก็จะได้ nylon ที่มี DNA (blot) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

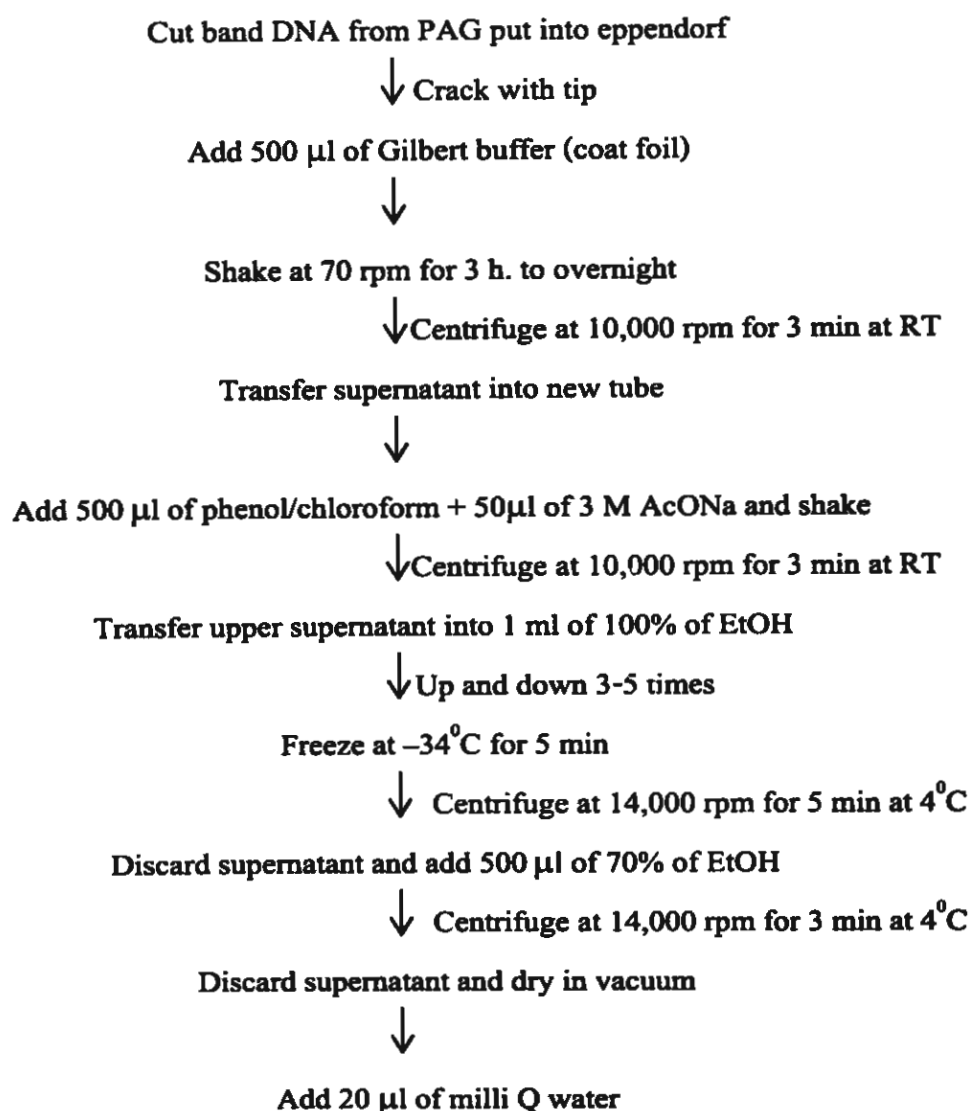


6.2.3 เตรียม Probe DNA ของ chitinase

นำ plasmid pUC19 ที่มี chitinase มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 1,100 bp มาสกัด fragment ออกมาทำเป็น probe

Plasmid	5 μ l (100 μ g)	Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l	
H ₂ O	3 μ l	
<i>Bam</i> HI	0.5 μ l	
<i>Sac</i> I	0.5 μ l	
Total	10 μl	

วิธีการสกัด DNA fragment จาก polyacrylamide gel



จากนั้นนำ fragment DNA chitinase มา 10 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม) ต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที เติมน้ำ 10 ไมโครลิตร ของ North2South ® Direct Stabilized HRP และ 10 ไมโครลิตร ของ North2South ® Direct Reaction Buffer บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 30 ไมโครลิตร ของ North2South ® Direct Enzyme Stabilized และเขย่า ซึ่งขณะนี้จะได้ probe เข้มข้น 1.67 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

6.2.4 เตรียมไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชัน

ผสม North2South ® Direct Hybridization Buffer Component 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ North2South ® Direct Hybridization Buffer Component 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติกปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่น Nylon Membrane ที่มี DNA (blot) ใส่ในสารผสมของ Hybridization Buffer บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

15 นาที เติม 60 มิลลิลิตร (100 นาโนกรัม) ของ HRP- label probe บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

6.2.5 ขั้นตอนการล้าง (Washes)

นำแผ่น nylon membrane แช่ใน 40 มิลลิลิตร ของ 2XSSC/0.1% SDS เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องจำนวน 3 ครั้ง และล้างด้วย 40 มิลลิลิตร ของ 2XSSC เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องจำนวน 3 ครั้ง

6.2.6 ขั้นตอน Substrate Development

นำแผ่น nylon membrane แช่ใน 5 มิลลิลิตรของ North2South ® Luminol/Enhancers Solution ผสมกับ 5 มิลลิลิตรของ North2South ® Stable Peroxide Solution บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำแผ่น nylon membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์มเป็นเวลา 45 นาที

6.2.7 ขั้นตอนการล้างฟิล์ม

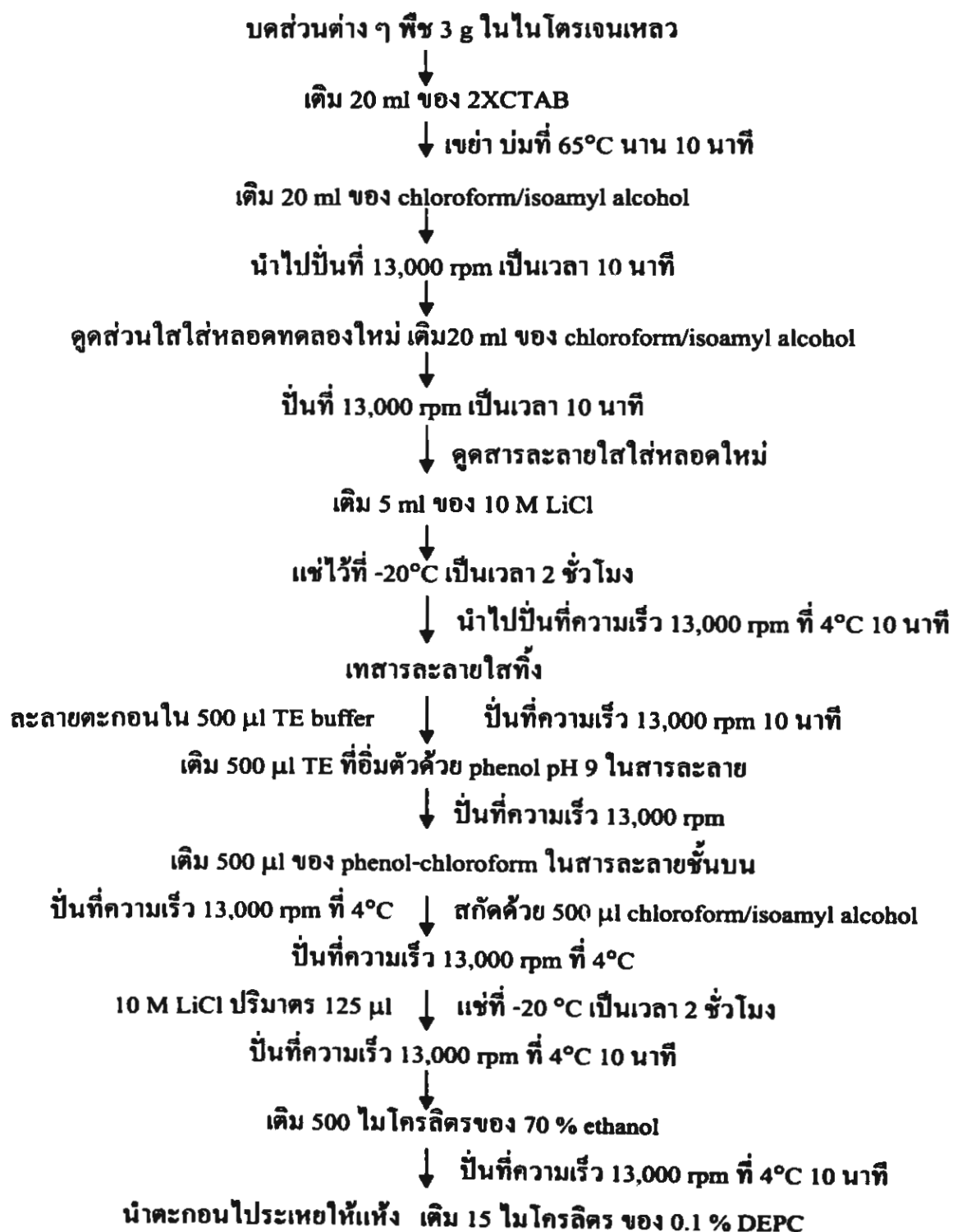
นำแผ่นฟิล์มมาล้างด้วยน้ำยา developer and replenisher เป็นเวลา 5 นาที 3% acetic เป็นเวลา 1 นาที น้ำยา fixer and replenisher เป็นเวลา 5 นาที และน้ำเป็นเวลา 15 นาที

6.3 การทำ Northern blot

6.3.1 สกัด RNA จากส่วนต่าง ๆ ของพืช ราก ต้น ใบ ที่มีอายุ 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน และ 4 เดือน ด้วยวิธี CTAB

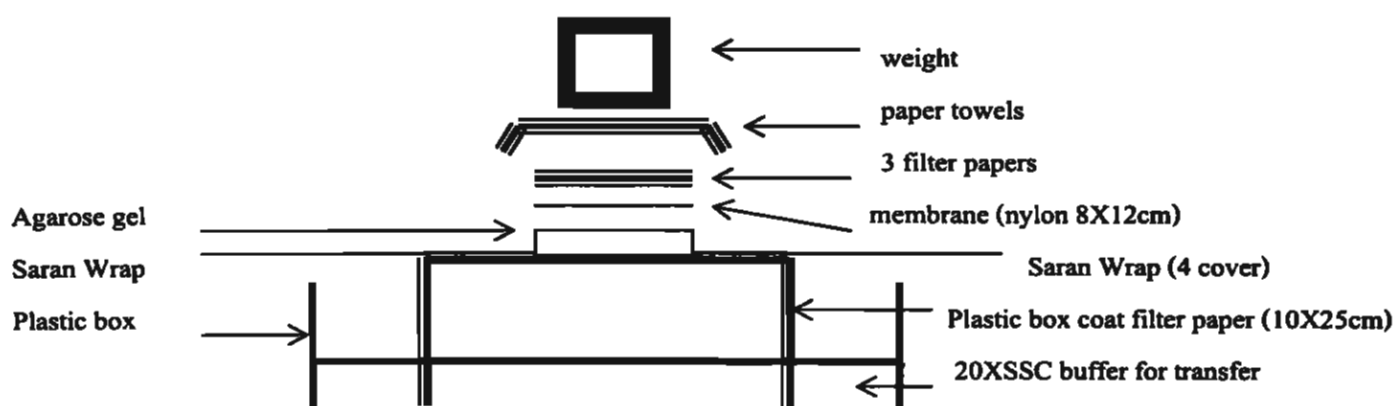
นำส่วนต่าง ๆ ของพืชมา 3 กรัม ใส่ในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียด ใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 20 มิลลิลิตร ของ 2XCTAB (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH9.5, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 5% β -mercaptoethanol) เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วสกัดด้วย 20 มิลลิลิตร ของ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสข้างบนใส่หลอดใหม่ แล้วสกัดด้วย 20 มิลลิลิตร ของ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสข้างบนใส่หลอดใหม่ เติม 5 มิลลิลิตร ของ 10 M LiCl เขย่าและนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนใน 500 ไมโครลิตรของ TE buffer นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายสารละลายใสหลอดใหม่ เติม 500 ไมโครลิตรของ TE ที่อิ่มตัวด้วย phenol pH 9 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายสารละลายใสหลอดใหม่ เติม 500 ไมโครลิตรของ phenol-chloroform นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ดูดสารละลายใส่ข้างบนใส่หลอดใหม่ แล้วสกัดด้วย 500 ไมโครลิตร ของ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่เติม 10 M LiCl ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ถ้างัดด้วย 500 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol ทำให้แห้งและเติม 15 ไมโครลิตร ของ 0.1 % DEPC ในน้ำกลั่นมาเชื้อ



6.3.2 ถ่าย chitinase RNA ไปบนเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส

นำ chitinase RNA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม) run บน agarose electrophoresis 1.2% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในสารละลาย TAE buffer ดังเจลดด้วยน้ำ deionized DEPC 2 ครั้ง แช่เจลในสารละลาย 0.05 M NaOH เป็นเวลา 20 นาที นำเจลไปแช่ในสารละลาย Neutralizing (0.1 M Tris-HCl pH 7.5) เป็นเวลา 45 นาที แช่แผ่น Nylon membrane ในน้ำ 5 นาที แล้วย้ายไปแช่ใน 20XSSC เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปวางบนกระดาษกรองที่จุ่มในสารละลาย 20XSSC แล้ววางแผ่น Nylon membrane ทับลงไปแล้วตามด้วยกระดาษกรอง 3 แผ่น กระดาษ towels และวางทับด้วยน้ำหนัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก็จะได้ nylon ที่มี DNA (blot) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

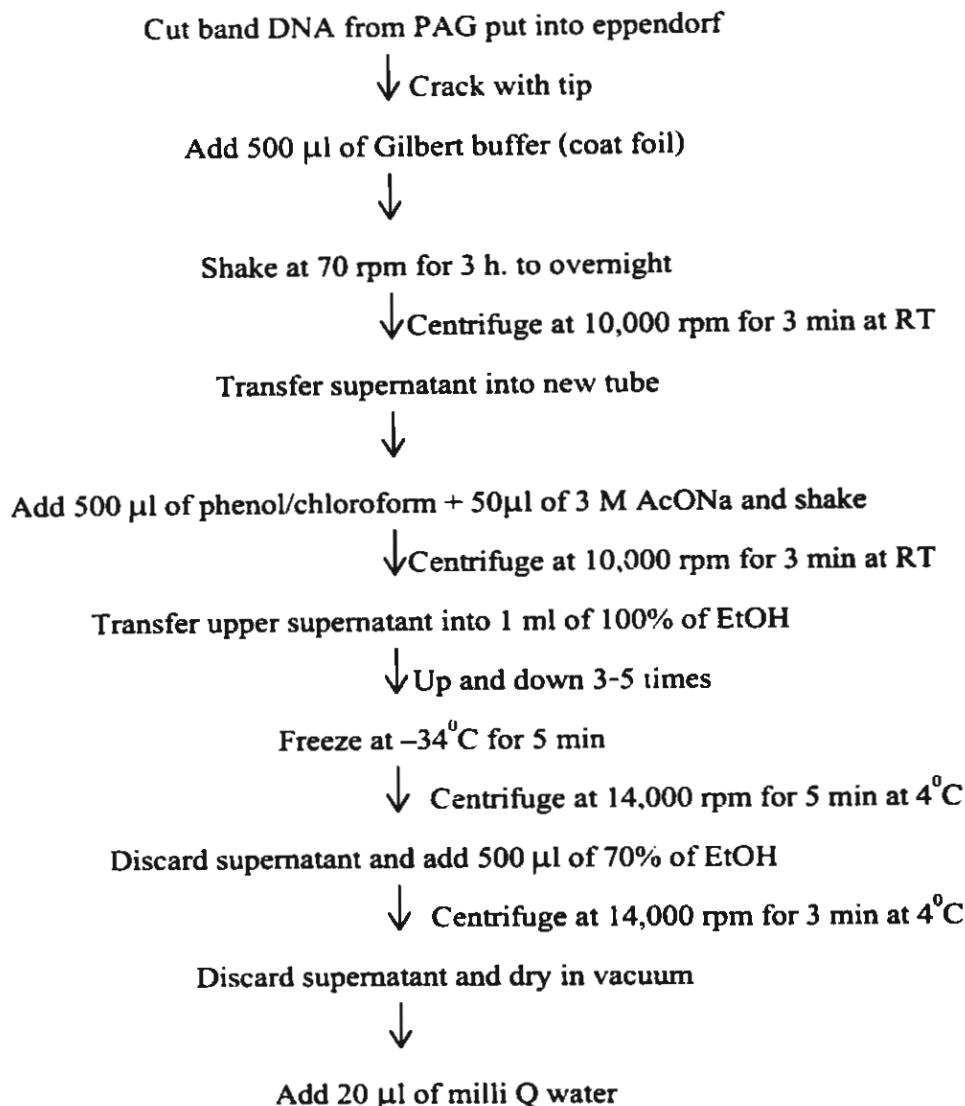


6.3.3 เตรียม Probe DNA ของ chitinase

นำ plasmid pUC19 ที่มี chitinase มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 1,100 bp มาสกัด fragment ออกมาทำเป็น probe

Plasmid	5 μ l (100 μ g)	Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l	
H ₂ O	3 μ l	
<i>Bam</i> HI	0.5 μ l	
<i>Sac</i> I	0.5 μ l	
Total	10 μl	

วิธีการสกัด DNA fragment จาก polyacrylamide gel



จากนั้นนำ fragment DNA chitinase มา 10 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม) ต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที เติมน้ำ 10 ไมโครลิตร ของ North2South® Direct Stabilized HRP และ 10 ไมโครลิตร ของ North2South® Direct Reaction Buffer บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 30 ไมโครลิตร ของ North2South® Direct Enzyme Stabilized และเขย่า ซึ่งขณะนี้จะได้ probe เข้มข้น 1.67 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

6.3.4 เตรียมไฮบริไดเซชันและไฮบริไดเซชัน

ผสม North2South® Direct Hybridization Buffer Component 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ North2South® Direct Hybridization Buffer Component 2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติกปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่น Nylon Membrane ที่มี DNA (blot) ใส่ในสารผสมของ Hybridization Buffer บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

15 นาที เติม 36 มิลลิลิตร (60 นาโนกรัม) ของ HRP- label probe บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

6.3.5 ขั้นตอนการล้าง (Washes)

นำแผ่น nylon membrane แฉใน 40 มิลลิลิตร ของ 2XSSC/0.1% SDS เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องจำนวน 3 ครั้ง และล้างด้วย 40 มิลลิลิตร ของ 2XSSC เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องจำนวน 3 ครั้ง

6.3.6 ขั้นตอน Substrate Development

นำแผ่น nylon membrane แฉใน 5 มิลลิลิตรของ North2South ® Luminol/Enhancers Solution ผสมกับ 5 มิลลิลิตรของ North2South ® Stable Peroxide Solution บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำแผ่น nylon membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์มเป็นเวลา 45 นาที

6.3.7 ขั้นตอนการล้างฟิล์ม

นำแผ่นฟิล์มมาล้างด้วยน้ำยา developer and replenisher เป็นเวลา 5 นาที 3% acetic เป็นเวลา 1 นาที น้ำยา fixer and replenisher เป็นเวลา 5 นาที และน้ำเป็นเวลา 15 นาที

6.4 การตรวจสอบ gus gene

นำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อของข้าวมาแช่ในสารละลาย X-gluc และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการบ่มแล้วไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกไป แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง จากนั้นดูดของเหลวทิ้งแล้วแช่ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ ของแอลกอฮอล์ จำนวน 2 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำทุกประมาณ 2 ชั่วโมง จำนวน 2-3 ครั้ง ถ้ามี gus activity จะมองเห็นสีน้ำเงิน

7. การทดสอบการต้านทานเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ของต้นข้าว

นำเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* มาเลี้ยงบนอาหารสูตร potato dextrose agar เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ผสมสารละลาย dioctyl sulfosuccinate เข้มข้น 0.05 พีพีเอ็ม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วฉีดพ่นบนต้นและใบข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ สังเกตผลของเชื้อต่อต้นข้าว

นำเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* มาเลี้ยงบนอาหารสูตร Potato Dextrose Agar



เป็นเวลา 7 วัน

นำเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* ผสมสารละลาย dioctyl sulfosuccinate 100 มิลลิลิตร



ฉีดพ่นบนต้นข้าว

สังเกตผลของเชื้อราต่อต้นข้าวภายใน 7 วัน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

สร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีนไคตินเนสจากกระดิ่งบ้าน

1 ตรวจสอบลำดับเบสของไคตินเนสที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pUC19 จาก BioService Unit (BSU) โดยการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI 3100 ได้ผลเป็นลำดับเบสของ chitinase ที่อยู่ในพลาสมิด pUC19 จำนวน 2 โคลน และโครมาโตแกรม ดังภาพที่ 4.1-4.6

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
AACGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGATTATCAAAATCCAAGAGATGGATAACAAG
N S Y D H D Y A K L A C L Q V D S R G S D Y Q I Q E M D N K

100     110     120     130     140     150     160     170     180
AACAAGATGGGGTGCCTTGTCTGTGCTGTGTACAGCCTCATGGTGGGAGGCTTAGCGGAGCAATGCCGCAGGCAGGCAGGGGGTGGC
N K M R V L L C V L L Y S L M V G G L A E Q C G R Q A G G A

190     200     210     220     230     240     250     260     270
TTGTGCCCCGGCCGCTCTGCTGCAGCCAATTCGGCTGGTGTGGTTCCACTAACGATTACTGCGGCCCGGTTGCCAGAGCCAGTGTAGC
L C P G R L C C S Q F G W C G S T N D Y C G P G C Q S Q C S

280     290     300     310     320     330     340     350     360
GGCAGCGGCCAGCCCCCTCCCTCCGGTGGCCTCGCCAGCATCATCTCCAGGGACACCTTCAATCAGATGCTCAAGCACCGCAACGACGCC
G S G P A P P S G G L A S I I S R D T F N Q M L K H R N D A

370     380     390     400     410     420     430     440     450
GCCTGCCCGGCCAATGGCTTCTACACCTACGATGCTTTTCATTAGGGCGGCCAATTCCTACCTGCTTCGGGCAGCACCGGTGATGCCGCC
A C P A N G F Y T Y D A F I Q A A N S Y P A F G S T G D A A

460     470     480     490     500     510     520     530     540
ACGCGCAAGAGGGAGGTGGCAGCTTTCTCGGCCAACTTCGCACGAGACCACAGGCGGTTGGCCAGCGCTCCCGACGGTCTTACGCC
T R K R E V A A F L G Q T S H E T T G G W P S A P D G P Y A

550     560     570     580     590     600     610     620     630
TGGGGTTACTGCTTCAACAGGAACGGAACCCACCAAGCGCTTACTGTCAACCCAGCTCCCAATATCCATGTGCTCCCGGCAAGCAATAC
W G Y C F K Q E R N P P S A Y C Q P S S Q Y P C A P G K Q Y

640     650     660     670     680     690     700     710     720
TATGGCCCGCGGACCCATGCAACTCTCTGGAAC TACAAC TACGGACAGTGGCGAAGAGCCATAGGAGCGGACTTGCTCAACAACCCCGAC
Y G R G P M Q L S W N Y N Y G Q C G R A I G A D L L N N P D

730     740     750     760     770     780     790     800     810
CTGGTGGCCAGTGATGCTGTGATATCCTTCAAGACGGCTCTGTGGTTCTGGATGACAGCGCAGTGGCCCAAGCCATCGTGCCACGACGTC
L V A S D A V I S F K T A L W F W H T A Q S P K P S C H D V

820     830     840     850     860     870     880     890     900
ATCACTGGGAGATGGACCCCCCTCCGGCGCCGACACGGCAGCGGGTCGACTTCCAGGGTACGGAAACCACCACCAACATCATCAACGGAGGC
I T G R W T P S G A D T A A G R L P G Y G T T T N I I N G G

910     920     930     940     950     960     970     980     990
CTGGAATGTGGAGAGGGCAGGACCCGAGGGTTGGCGATCGCATTTGGATTTTTCAGAGATACTGGCAGATTCTGGGTGTGGCTATGGC
L E C G R G Q D P R V A D R I G F F K R Y C D I L G V G Y G

1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
TCCAACCTCGACTGCTATTCCAGAGGCCATTGGCTCTTCTCTCACTCATCGACGCTCTCTAATCTCATCTCACTAGTCTCATATGTGTC
S N L D C Y S Q R P F G S S S L I D V L (*) S H L T S L I C V

1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150
GCTCTGCCCTACTCTTATTCAATAAAATCAAGCGCCCGCGAATTCANCTGGCCCTCGTTTACAANCNN
A L P Y S Y S I K S S G R E F X W P S F T X

```

ภาพที่ 4.1 ลำดับเบสของไคตินเนสที่ได้จากโครมาโตแกรมและแปลเป็นกรดอะมิโนจากโคลนที่ 1 และโคลนที่ 2 ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AACaGCTaTGACCATGATTACGCCAAGCTTGCCATGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGATTATCAAATCCAAGAGATGGATAACAAG
      /      /      /      /
      HindIII  PstI  XbaI  BamHI

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
AACAAAGATGCGGGTGCTCTTGTTGTGTGCTGCTGTACAGCCTCATGGTGGGAGGCTTAGCGGAGCAATGCCGGCAGGCAGGCAGGGGGTGCC

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
TTGTGCCCCGCGCCCTCTGCTGCAGCCAATTCGGCTGGTGTGGTTCCACTAACGATTACTGCGGCCCGGTTGCCAGAGCCAGTGTAGC
      /
      PstI

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
GGCAGCGGGCCAGCCCCCTCCCTCCGGTGGCCTCGCCAGCATCATCTCCAGGGACACCTTCAATCAGATGCTCAAGCACCGCAACGACGCC

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
GCCTGCCCCGCCAATGGCTTCTACACCTACGATGCTTTTCATTACAGCGGCCAATCTTACCTGCCTTCGGCAGCACCGGTGATGCCGCC

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
ACGCGCAAGAGGGAGGTGGCAGCTTTCCTCGGCCAACTTCGCACGAGACCACAGGCGGTGGCCACGGCTCCCGACGGTCTTACGCC

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
TGGGGTTACTGCTTCAAACAGGAACGGAACCCACCAAGCGCTTACTGTCAACCCAGCTCCCAATATCCATGTGCTCCCGGCAAGCAATAC

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
TATGGCCCGGACCCCATGCAACTCTCCTGGAAC TACAAC TACGGACAGTGC GGAAGAGCCATAGGAGCGGACTTGCTCAACAACCCCGAC
      /
      SacII

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
CTGGTGGCCAGTGATGCTGTGATATCCTTCAAGACGGCTCTGTGGTTCTGGATGACAGCGCAGTCGCCCCAAGCCATCGTGCCACGACGTC

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
ATCACTGGGAGATGGACCCCCCTCCGGCGCCGACACGGCAGCGGGTCGACTTCCAGGGTACGGAACCACCACCAACATCATCAACGGAGGG

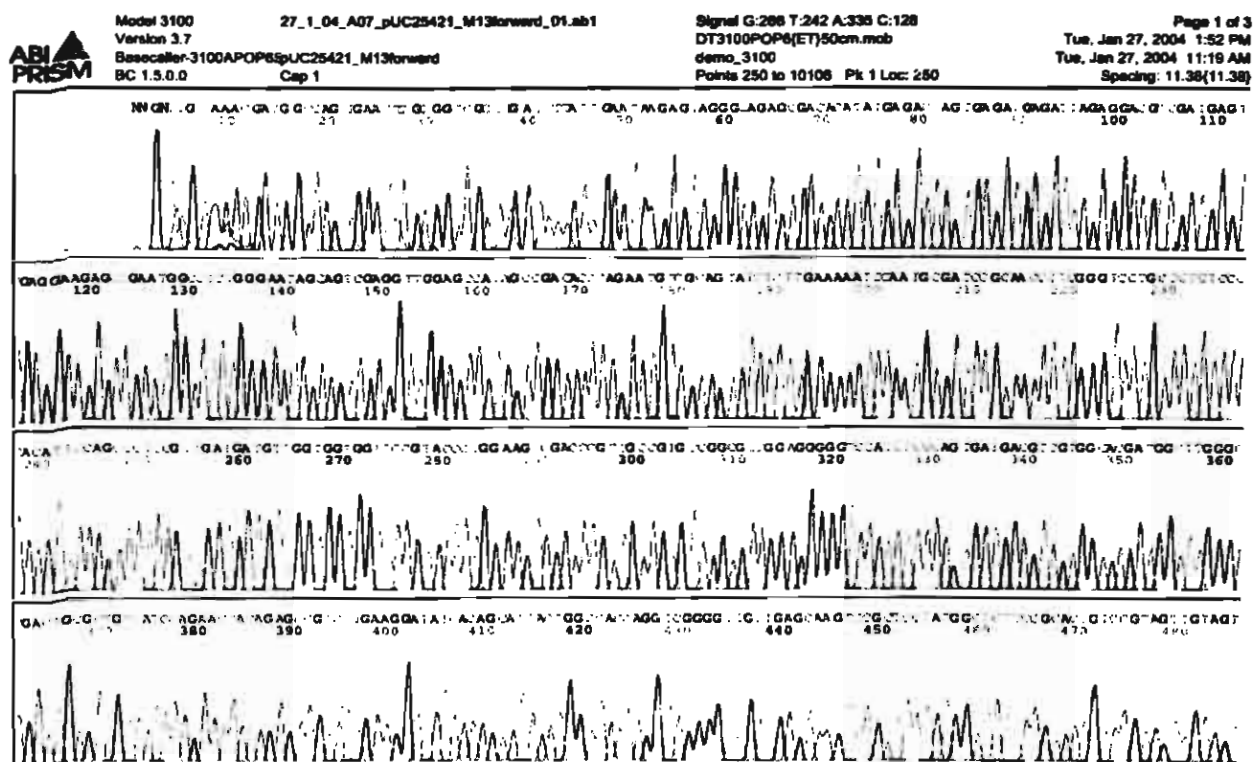
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
CTGGAATGTGGGAGAGGGCAGGACCCGAGGGTTGCGGATCGCATTGGATTTTTCAAGAGATACTGCGACATTCTGGGTGTGCGCTATGGC

      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
TCCAACCTCGACTGCTATTCCAGAGGCCATTCCGGCTCTTCTCACTCATCGACGTCCTCTAATCTCATCTCACTAGTCTCATATGTGTC
      /
      NdeI

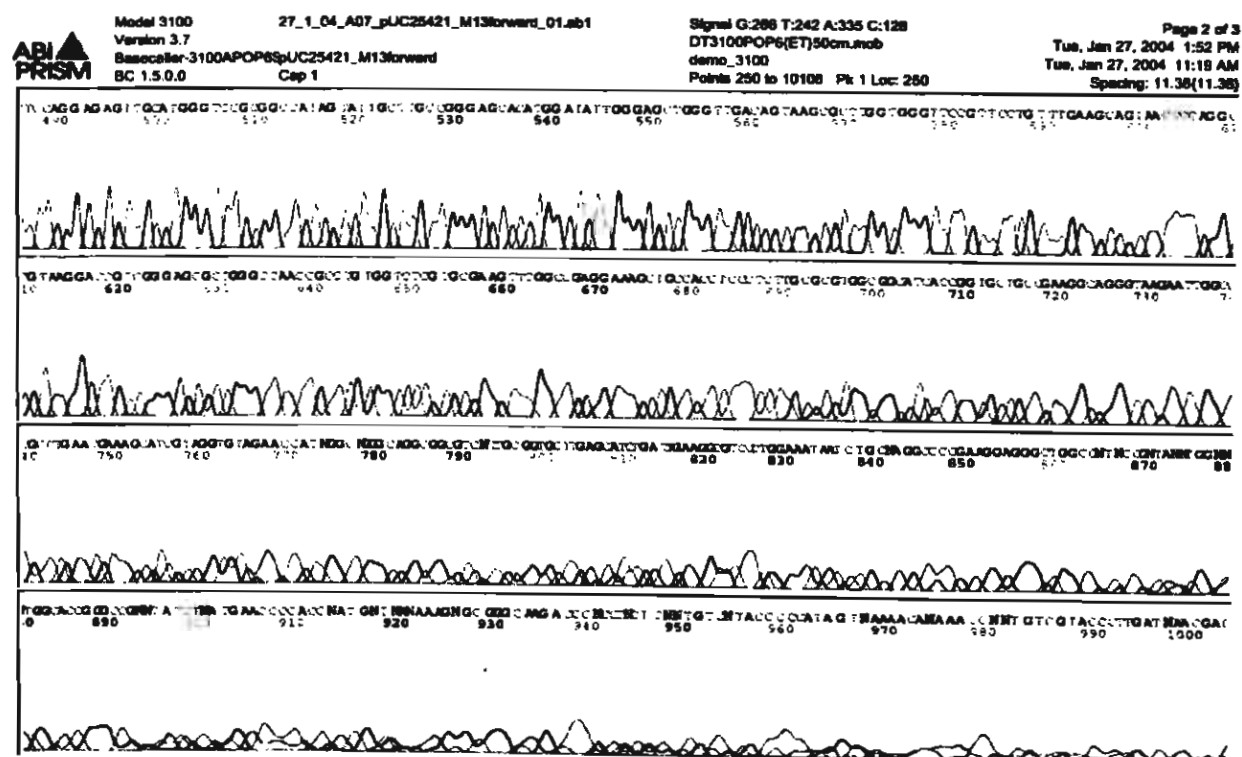
      1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150
GCTCTGCCCTACTCTTATTCAATAAAATCAAGCGGCGCGAATTCANCTGGCCGTCGTTTACAANCNN
      /      /
      EcoRI  HindIII

```

ภาพที่ 4.2 จุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในลำดับเบสของโคตินีน



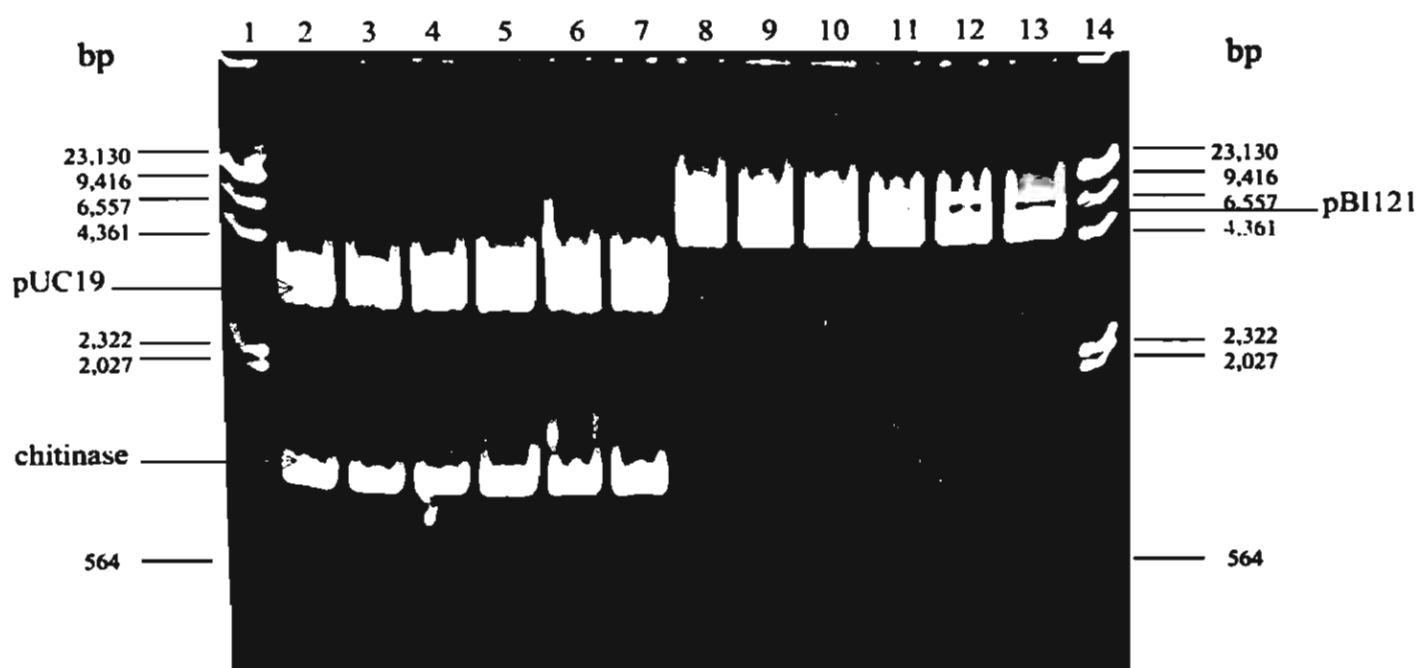
ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมเบสของโคดีนในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ primer forward โคลนที่ 1



ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมเบสของโคดีนในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ primer reverse โคลนที่ 1

ภาพที่ 4.6 โครมาโตแกรมเบสของโคคิเนสในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ primer reverse โคลนที่ 2

2 พลาสมิด pUC19 ที่มียีนไคตินเนสจากกระถินบ้านขนาดประมาณ 1,100 bp ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis TBE buffer และพลาสมิด pBI121 ขนาดประมาณ 6,150 bp ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis TBE buffer ดังภาพที่ 4.7



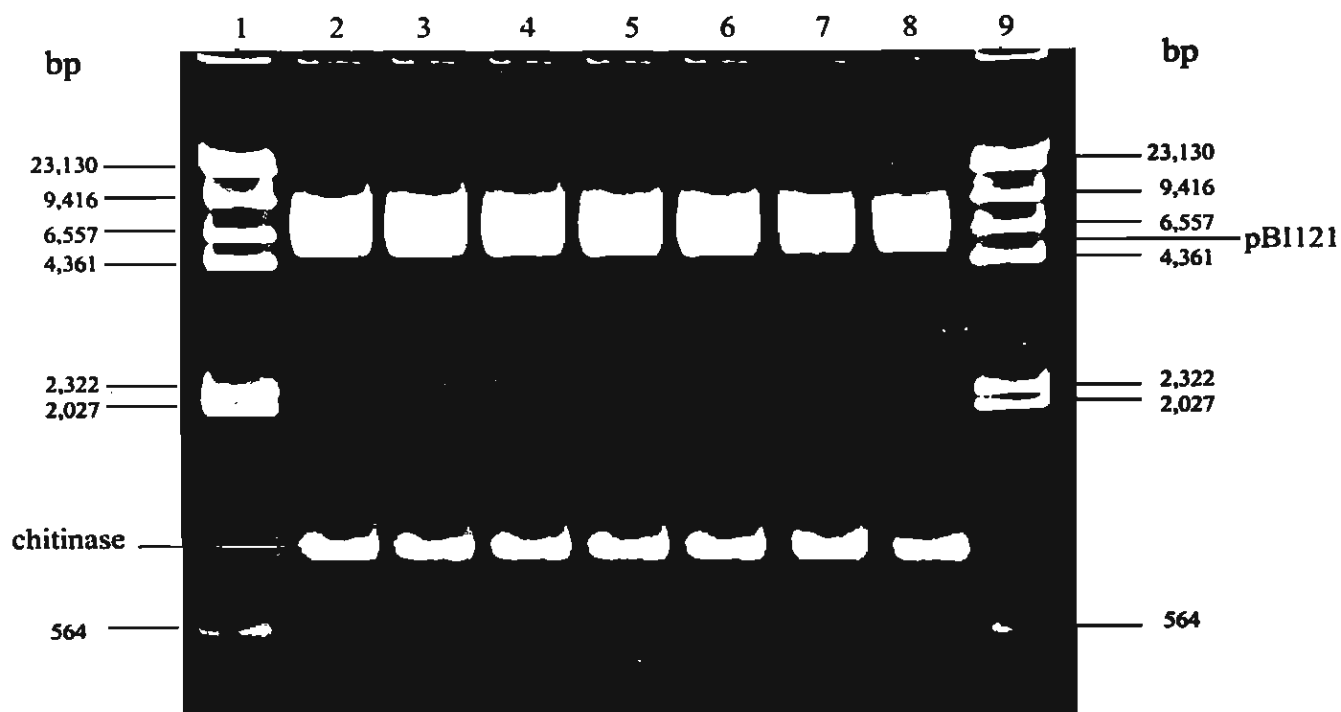
ภาพที่ 4.7 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pUC19 และไคตินเนสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I และแบนด์ของพลาสมิด pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I

Lane 1, 14: λ /Hind III marker

Lane 2-7: *Bam* HI and *Sac* I digested recombinant plasmid pUC19 + chitinase

Lane 8-13: *Bam* HI and *Sac* I digested plasmid pBI121

3 เชื่อมพลาสมิด pBI121 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I กับ DNA fragment ของไคตินเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I โดยใช้เอนไซม์ T₄ DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight นำ recombinant DNA ที่ได้ไป transformed เข้าสู่ *E.coli* DH5 α บนอาหาร LB plate ที่มี kanamycin 50 mg/L เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้โคโลนีเกิดขึ้นนำโคโลนีมาตรวจหาอินไคตินเนสในพลาสมิด pBI121 โดยสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I จะต้องมีแบนด์ขนาดประมาณ 1,100 bp ของยีนไคตินเนส และแบนด์ขนาดประมาณ 6,150 bp ของพลาสมิด pBI121 ดังภาพที่ 4.8

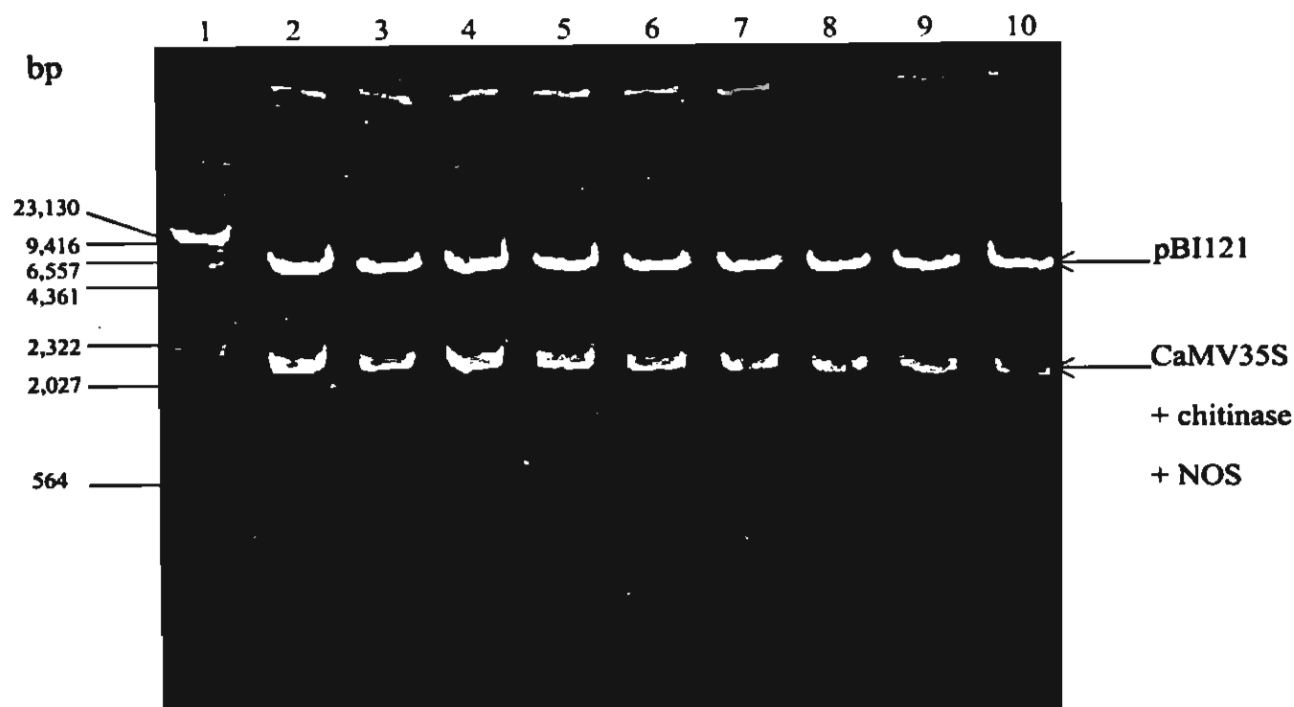


ภาพที่ 4.8 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pBI121 และไคตินเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I

Lane 1, 9: λ /Hind III marker

Lane 2-8: *Bam* HI and *Sac* I digested recombinant plasmid pBI121 + chitinase

4 นำพลาสมิด pBI121 ที่มียีนไคตินเนสมาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที จะได้แบนด์ขนาด 5,009 bp ของ pBI121 ที่ไม่มี promoter CaMV35S และ NOS และแบนด์ขนาดประมาณ 2,206 bp นำเจลมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 2,206 bp ที่มี promoter CaMV35S ขนาด 870 bp ยีนไคตินเนส ขนาด 1,065 bp และ NOS ขนาด 271 bp ดังภาพที่ 4.9

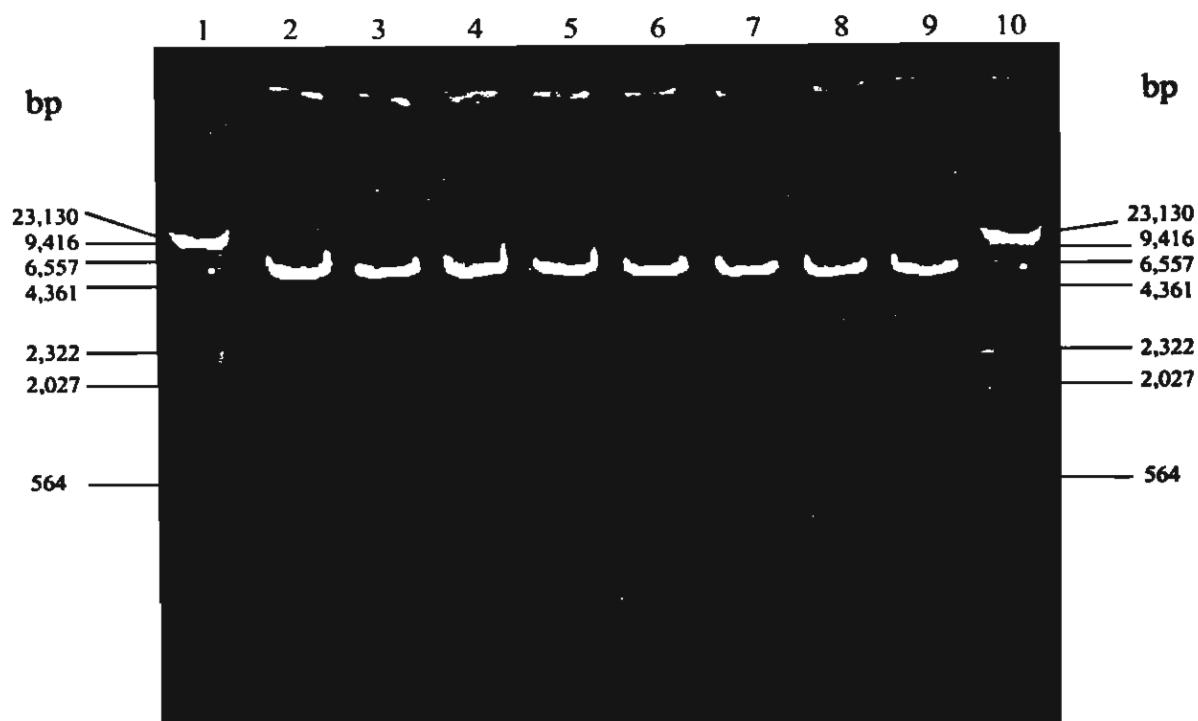


ภาพที่ 4.9 ขนาดแบนด์ของแบนด์ของพลาสมิด pBI121 และ promoter CaMV35S + chitinase + NOS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I

Lane 1: λ /Hind III marker

Lane 2-10: *Hind* III และ *Eco* RI digested recombinant plasmid pBI121 + chitinase

5 นำพลาสมิด pCAMBIA 1300 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 8,958 bp ดังภาพที่ 4.10

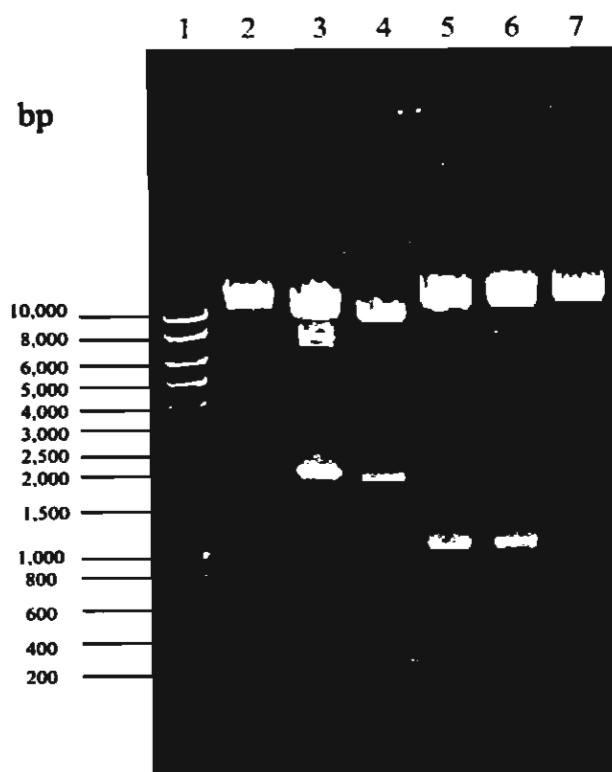


ภาพที่ 4.10 แบนด์ขนาด 8,958 bp ของพลาสมิด pCambia 1300

Lane 1: λ /Hind III marker

Lane 2-10: Hind III และ Eco RI digested recombinant plasmid pCambia

6 นำพลาสมิด pCambia1300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ Hind III และ Eco RI มาเชื่อมต่อกับ DNA fragment ขนาดประมาณ 2,206 bp ที่มี promoter CaMV35S ขนาด 870 bp ยีนไคตินเนส ขนาด 1,065 bp และ NOS ขนาด 271 bp โดยใช้เอนไซม์ T₄ DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight จากนั้นนำ recombinant DNA ที่ได้ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α บนอาหาร LB plate ที่มี kanamycin 50 mg/L เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้โคโลนีเกิดขึ้น เลือกโคโลนีที่ได้มาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ Hind III และ Eco RI, เอนไซม์ Hind III และ Bam HI, เอนไซม์ Bam HI และ Sac I, เอนไซม์ Sac I และ EcoR I, เอนไซม์ Bam HI และ EcoR I จะได้แบนด์ขนาดประมาณ 2,206 bp ของ promoter CaMV35S + chitinase + NOS แบนด์ขนาด 870 bp ของ promoter CaMV35S, แบนด์ขนาด 1,100 bp ของ chitinase แบนด์ขนาด 271 bp ของ NOS และแบนด์ขนาด 1336 bp ของ chitinase + NOS ดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pCAMBIA 1300, promoter CaMV35S, chitinase และ NOS

Lane 1: HyperLadder I DNA marker

Lane 2: *Hind* III และ *Bam* HI digested recombinant plasmid pCAMBIA 1300

Lane 3: *Hind* III และ *Eco* RI digested recombinant plasmid pCAMBIA 1300

Lane 4: *Hind* III และ *Sac* I digested recombinant plasmid pCAMBIA 1300

Lane 5: *Bam* HI และ *Eco* RI digested recombinant plasmid pCAMBIA 1300

Lane 6: *Bam* HI และ *Sac* I digested recombinant plasmid pCAMBIA 1300

Lane 7: *Sac* I และ *Eco* RI digested recombinant plasmid pCAMBIA 1300

จากภาพที่ 4.11 lane ที่ 2 มีแบนด์ขนาด 870 bp ของ promoter CaMV35S, lane ที่ 3 มีแบนด์ขนาด 1,935 bp และแบนด์ขนาด 271 bp ซึ่งปกติควรจะมีแบนด์เดียวขนาด 2,206 bp ของ promoter CaMV35S + chitinase + NOS แต่เนื่องจากที่ปลายของ chitinase มีบริเวณจุดตัดของ *Eco* RI จึงทำให้ตัด NOS ขนาด 271 bp จึงเหลือแบนด์ขนาด 1,935 bp, lane ที่ 4 มีแบนด์ขนาด 1,980 bp ของ promoter CaMV35S ขนาด 870 bp + chitinase ขนาด 1,100 bp, lane ที่ 5 มีแบนด์ขนาด 1,371 bp ของ chitinase ขนาด 1,100 bp + NOS ขนาด 271 bp, lane ที่ 6 มีแบนด์ขนาด 1,100 bp ของ chitinase, lane ที่ 7 มีแบนด์ขนาด ขนาด 271 bp ของ NOS

การศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกซิชิการิให้เจริญเป็นแคลลัส (control)

จากการศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกซิชิการิ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB medium ที่เติม 2,4-D โดยเฉพาะเลี้ยงไว้ในที่มีดเป็นเวลา 5 สัปดาห์ เกิดแคลลัสของข้าวคอกมะลิ 105 เท่ากับ 97.5 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่งอกรากเท่ากับ 86.75 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดขึ้นเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของข้าวโกซิชิการิเกิดแคลลัส 69.75 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่งอกรากเท่ากับ 43.75 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสที่เกิดขึ้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.1, 4.2 และภาพที่ 4.12- 4.18

ตารางที่ 4.1 อัตราการเกิดแคลลัสที่ได้จากการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105

ครั้งที่	จำนวนเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่งอกราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น
1	100	95	80	75
2	100	98	85	75
3	100	98	89	70
4	100	99	93	79
	เฉลี่ย	97.5	86.75	74.75

ตารางที่ 4.2 อัตราการเกิดแคลลัสที่ได้จากการชักนำเมล็ดข้าวโกซิชิการิ

ครั้งที่	จำนวนเมล็ดข้าวโกซิชิการิ	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่งอกราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น
1	100	78	70	60
2	100	80	75	65
3	100	80	75	65
4	100	83	73	65
	เฉลี่ย	82.41	73.25	63.75



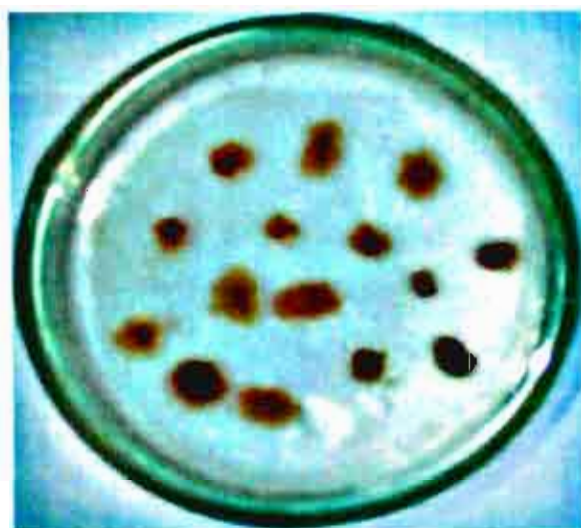
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.12 แคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกจิฮิการิ



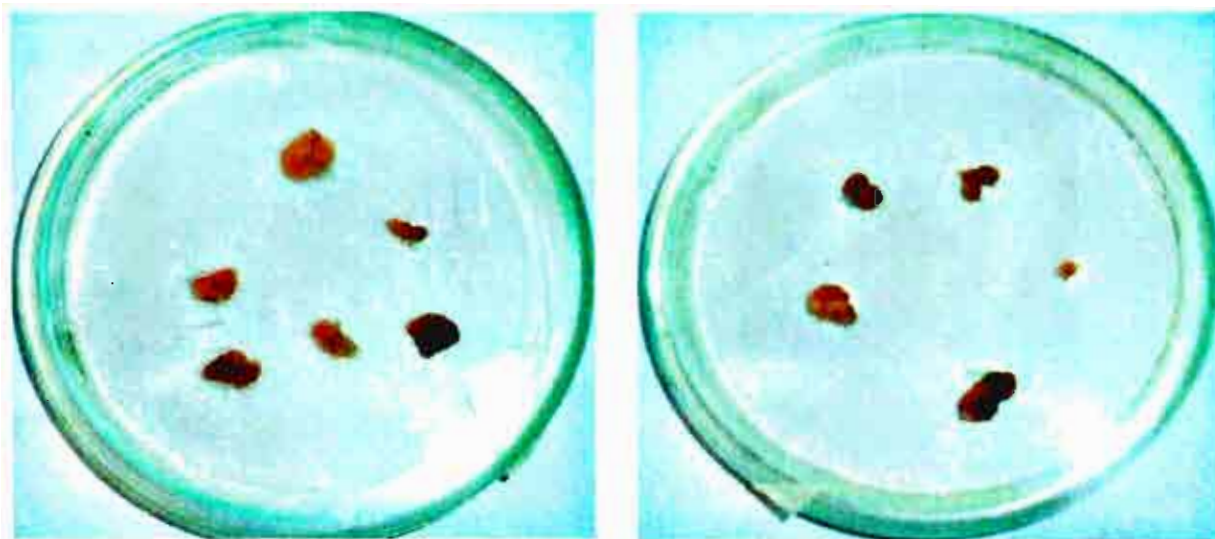
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.13 แคลลัสข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 5 สัปดาห์

(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกจิฮิการิ



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4.14 แคลลัสของข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RN ในที่มีดเป็นเวลา 1 สัปดาห์

(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิอิการิ



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.15 แคลลัสของข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RN ในที่สว่างเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีรากงอก

และเกิดจุดสีเขียว (ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิอิการิ



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.16 ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยง บนอาหารสูตร RNในที่สว่างเป็นเวลา 7 สัปดาห์ มีลำต้น

(ก) ดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกธิธิการิ



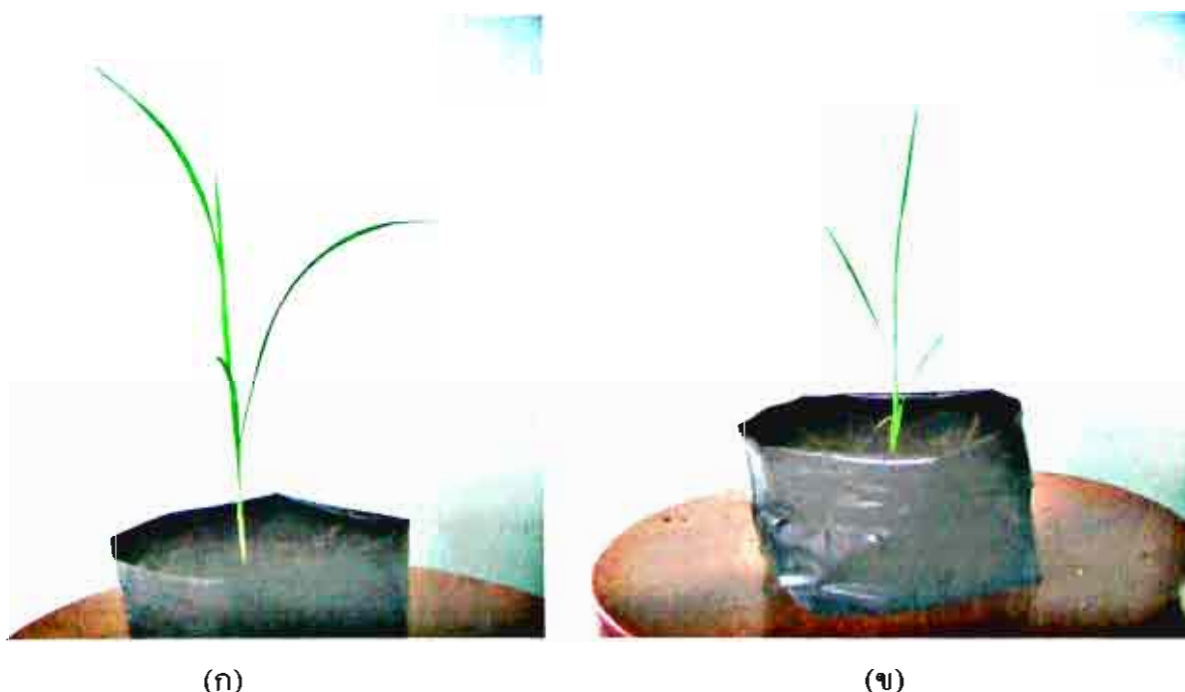
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.17 ต้นข้าวที่เพาะลงดินในที่สว่างเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีลำต้น

(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกธิธิการิ



ภาพที่ 4.18 ต้นข้าวที่เพาะลงดินในที่สว่างเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีลำต้น
(ก) ข้าวหอมมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ

แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส

จากการศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB medium ที่เติม 2,4-D โดยเพาะเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ข้าวหอมมะลิ 105 ที่มีการถ่ายยีน pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301 สำหรับเป็นตัวควบคุม จะมีแคลลัสเจริญและงอกรากเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียวเท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน pCAMBIA 1300 ที่มียีน chitinase แทรกอยู่จะมีแคลลัสเจริญและงอกรากเท่ากับ 54.67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียวเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.3 – 4.4 และภาพที่ 4.19- 4.22

ส่วนของข้าวโกชิฮิการิที่มีการถ่ายยีน pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301 สำหรับเป็นตัวควบคุม จะมีแคลลัสเจริญและงอกรากเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดจุดสีเขียวเท่ากับ 26 เปอร์เซ็นต์ และยีน pCAMBIA 1300+Chitinase แคลลัสที่เกิดรากเท่ากับ 42.67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดจุดสีเขียวเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.5 – 4.6 และภาพที่ 4.19, 4.22

ตาราง 4.3 จำนวนแคลลัสข้าวดอกมะลิ 105 ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301

ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	50	38
2	100	60	36
3	100	55	34
	เฉลี่ย	55	36

ตาราง 4.4 จำนวนแคลลัสข้าวดอกมะลิ 105 ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300+Chitinase

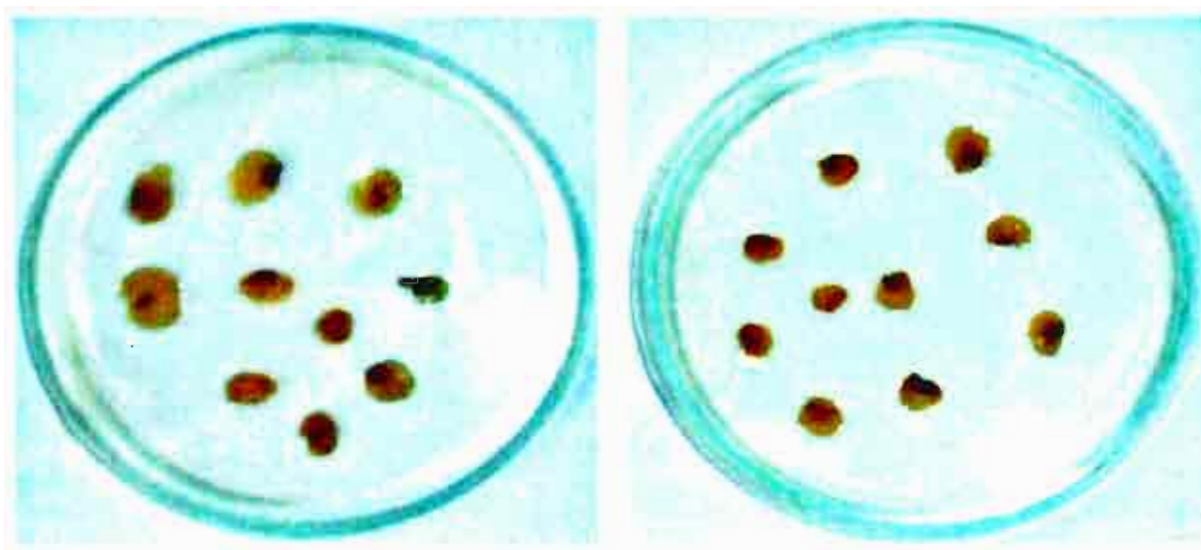
ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	60	38
2	100	50	30
3	100	54	32
	เฉลี่ย	54.67	30

ตาราง 4.5 จำนวนแคลลัสข้าวโกซิกาวรี ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301

ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	50	26
2	100	52	28
3	100	48	24
	เฉลี่ย	50	26

ตาราง 4.6 จำนวนแคลลัสข้าวโกซิกาวรี ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 + Chitinase

ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	42	24
2	100	40	22
3	100	46	20
	เฉลี่ย	42.67	22



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4.19 แคลลัสข้าวที่ทำการถ่ายขึ้นและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 5 สัปดาห์
(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกจิฮิการิ

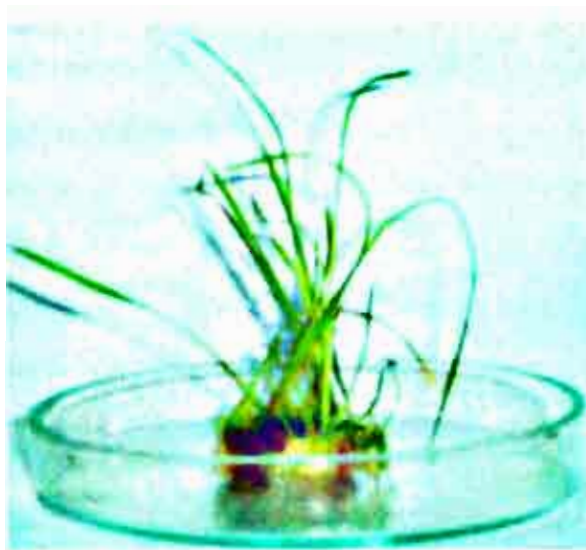


(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.20 แคลลัสข้าวที่ทำการการถ่ายขึ้นและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร RN เป็นเวลา 8 สัปดาห์
(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกจิฮิการิ



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.21 ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RN ในที่สว่างเป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีลำต้น
(ก) คอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกธิธิการิ



(ก)

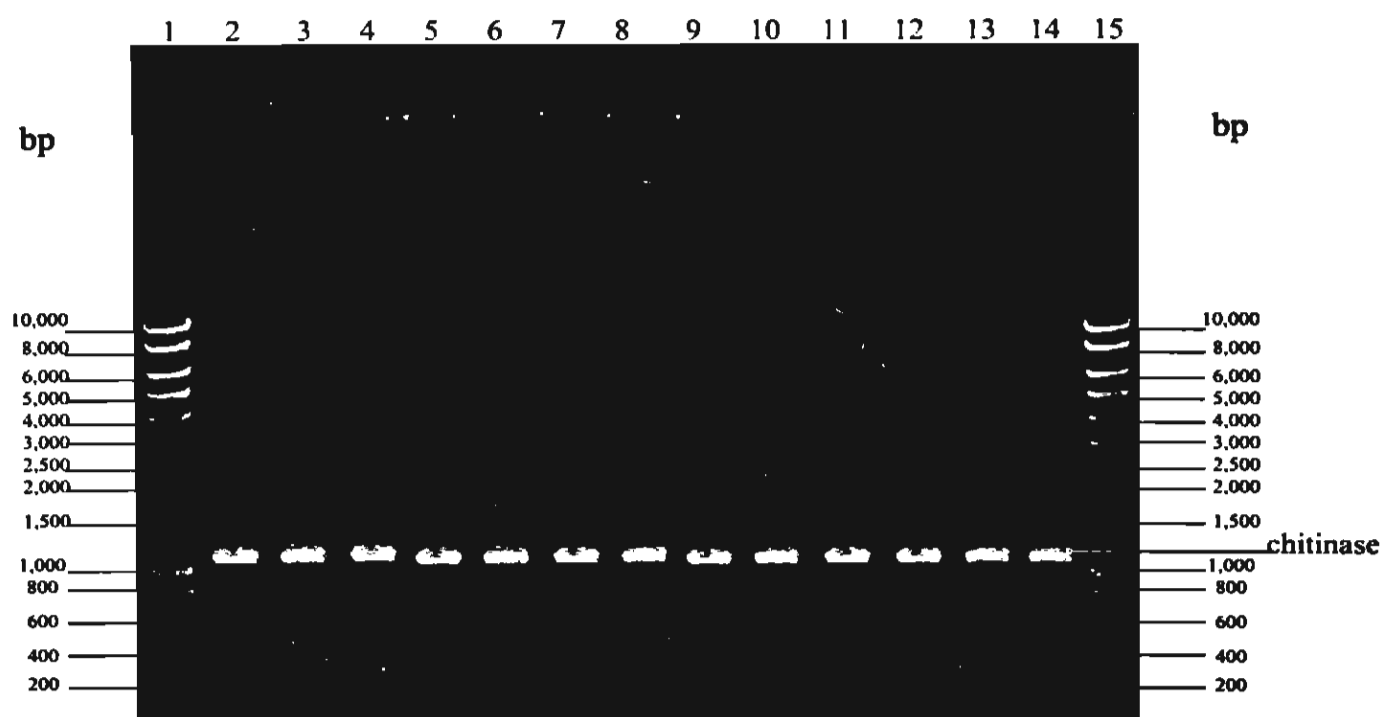


(ข)

ภาพที่ 4.22 ต้นข้าวที่เพาะลงดินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ข้าวคอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกธิธิการิ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยใช้วิธี PCR

จากการนำราก ต้น และใบ ของต้นข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ ที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ซึ่งถูกถ่ายยีนไคติเนสเข้าไป มาสกัด DNA แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกมียีนไคติเนสในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว พบว่ามีการแสดงออกทุกบริเวณของต้นข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิคือ ในราก ต้น และใบ ในทุก 1, 2, 3 และ 4 เดือน ดังภาพที่ 4.23 และภาพที่ 4.24



ภาพที่ 4.23 ขนาดแบนด์ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวคอกมะลิ 105

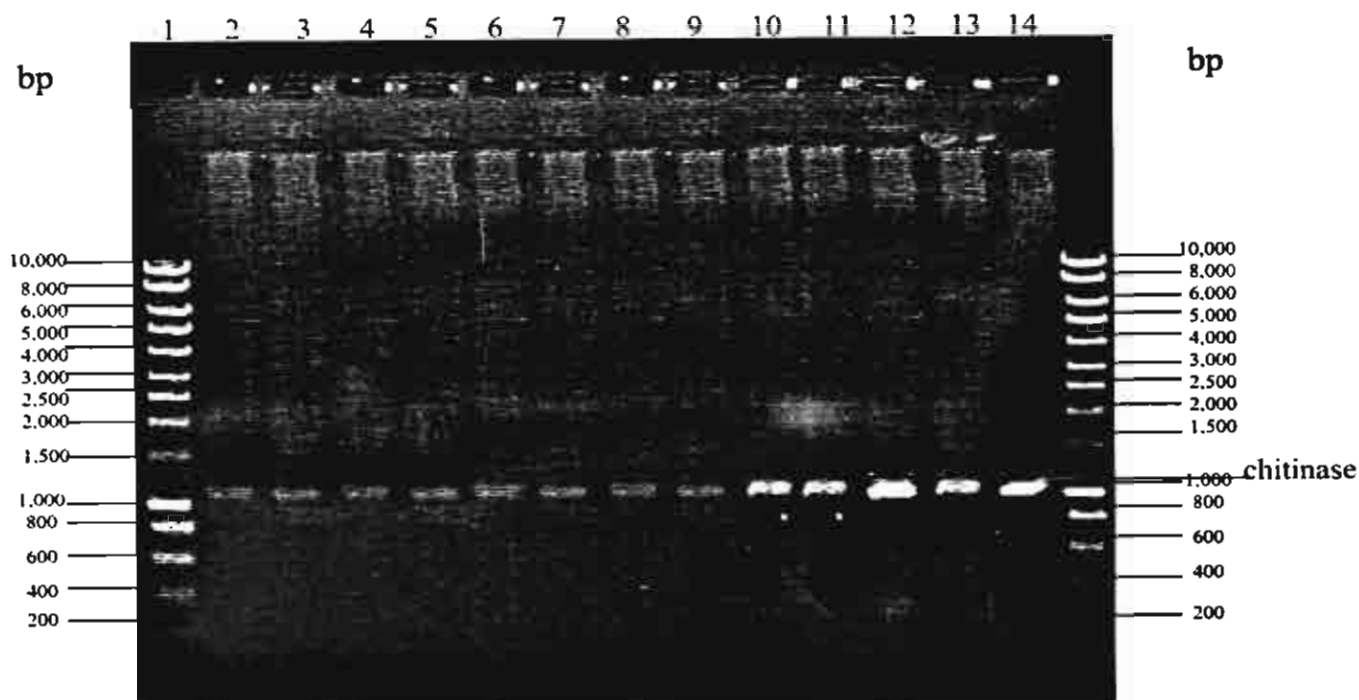
Lane 1, 15: HyperLadder I DNA marker

Lane 2-4: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 1 เดือน ตามลำดับ

Lane 5-7: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 2 เดือน ตามลำดับ

Lane 8-10: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 3 เดือน ตามลำดับ

Lane 11-14: PCR product ของ ราก ลำต้น ใบ และเมล็ดของข้าวอายุ 4 เดือน ตามลำดับ



ภาพที่ 4.24 ขนาดแบนด์ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวโกชิฮิการิ

Lane 1, 15: HyperLadder I DNA marker

Lane 2-4: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 1 เดือน ตามลำดับ

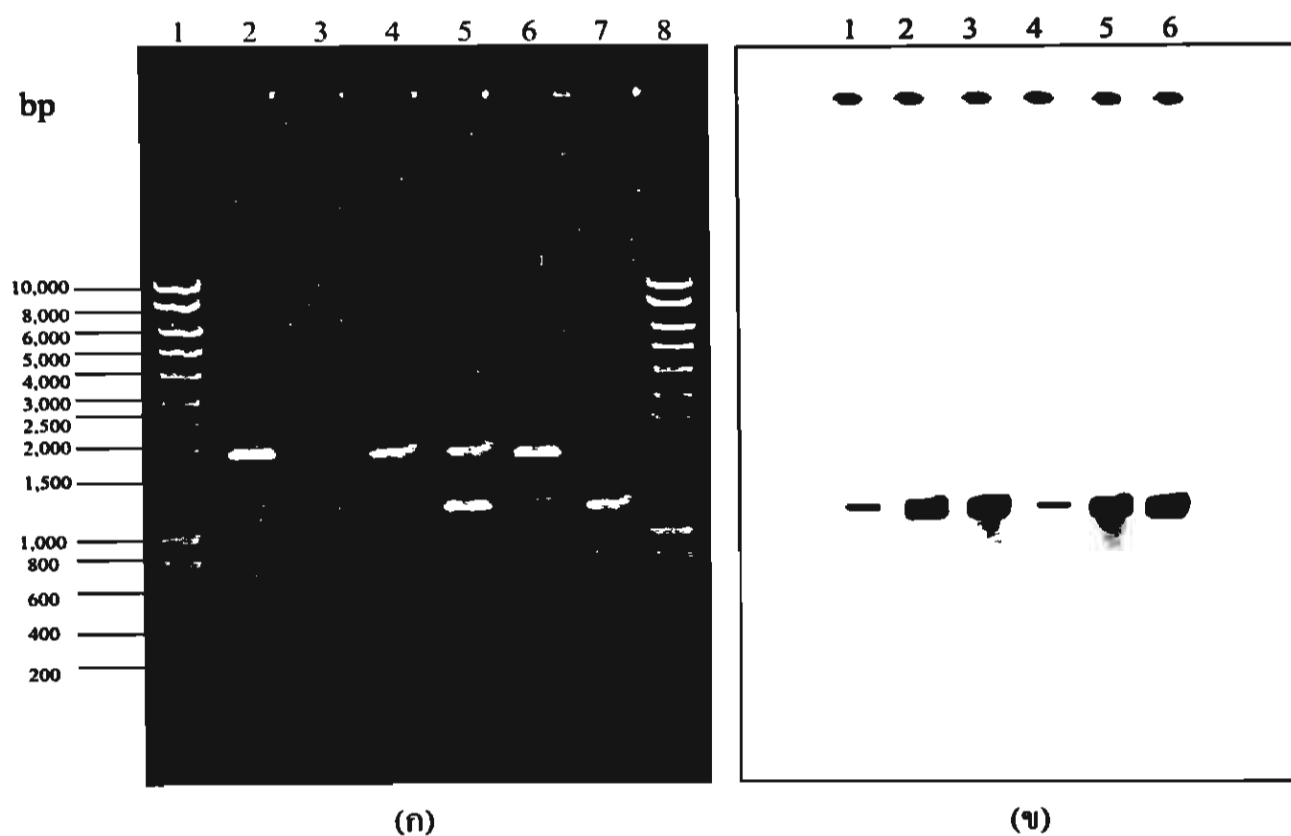
Lane 5-7: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 2 เดือน ตามลำดับ

Lane 8-10: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 3 เดือน ตามลำดับ

Lane 11-14: PCR product ของ ราก ลำต้น ใบ และเมล็ด ของข้าวอายุ 4 เดือน ตามลำดับ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคตินเนสโดยใช้วิธี Northern blot

จากการนำราก ต้น และใบ ของต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ซึ่งถูกถ่ายยีนไคตินเนสเข้าไป มาสกัด DNA แล้วนำไปไฮบริไดเซชันกับ probe ที่เตรียมมาจากลำดับเบส DNA ของไคตินเนส DNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกมียีนไคตินเนสขนาดประมาณ 1,100 bp ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว พบว่ามีการแสดงออกทุกบริเวณของต้นข้าว คือ ในราก ต้น และใบ ในทุก 1, 2, 3 และ 4 เดือนรวมทั้งในเมล็ด แต่ในรากจะมีการแสดงออกน้อยที่สุด ส่วนต้น ใบ และเมล็ดจะมีการแสดงออกใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.25-4.28



ภาพที่ 4.25 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิอิการิ 105 อายุ 1 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

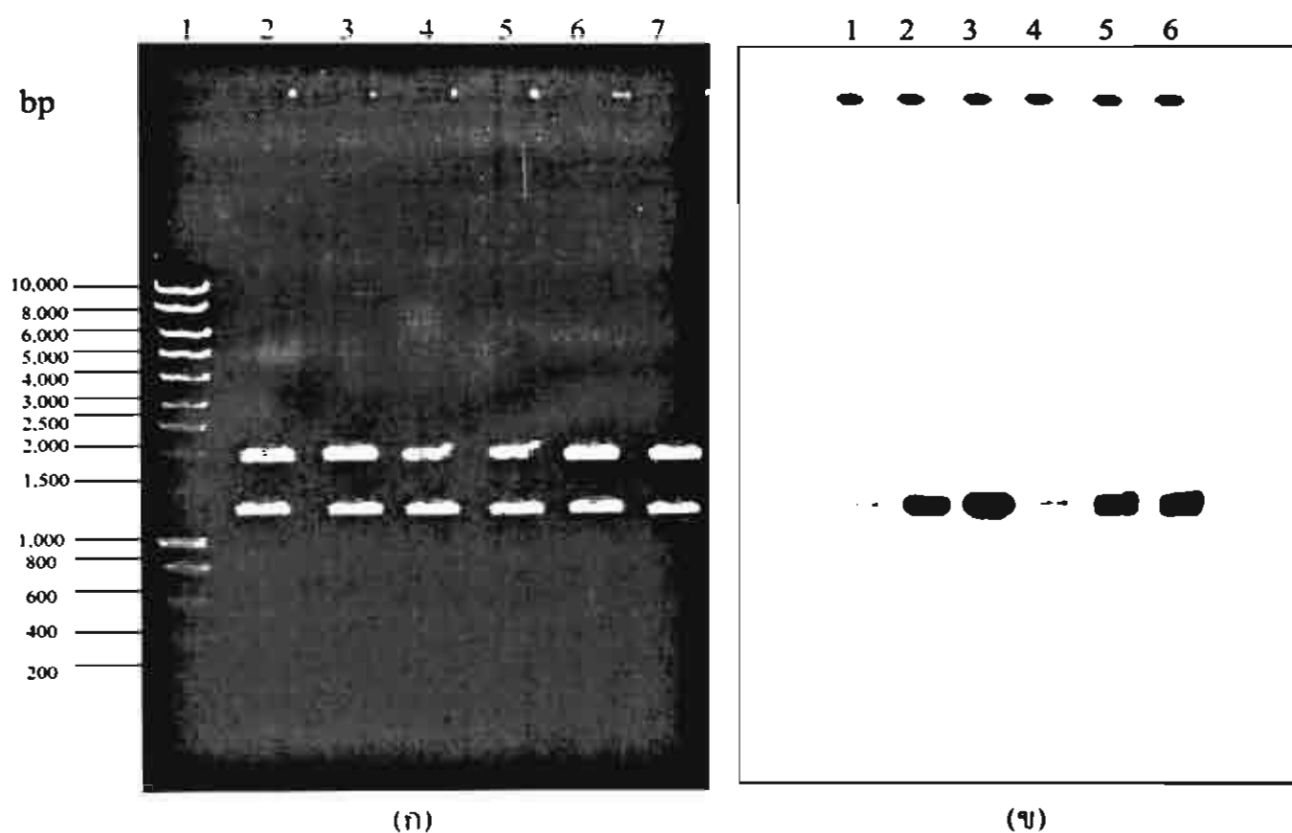
Lane 2-4: RNA จาการาก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: RNA จาการาก ต้น และใบของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ

(ข) RNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ อายุ 1 เดือน

Lane 1-3: RNA blotting gel จาการาก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: RNA blotting gel จาการาก ต้น และใบของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.26 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 2 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

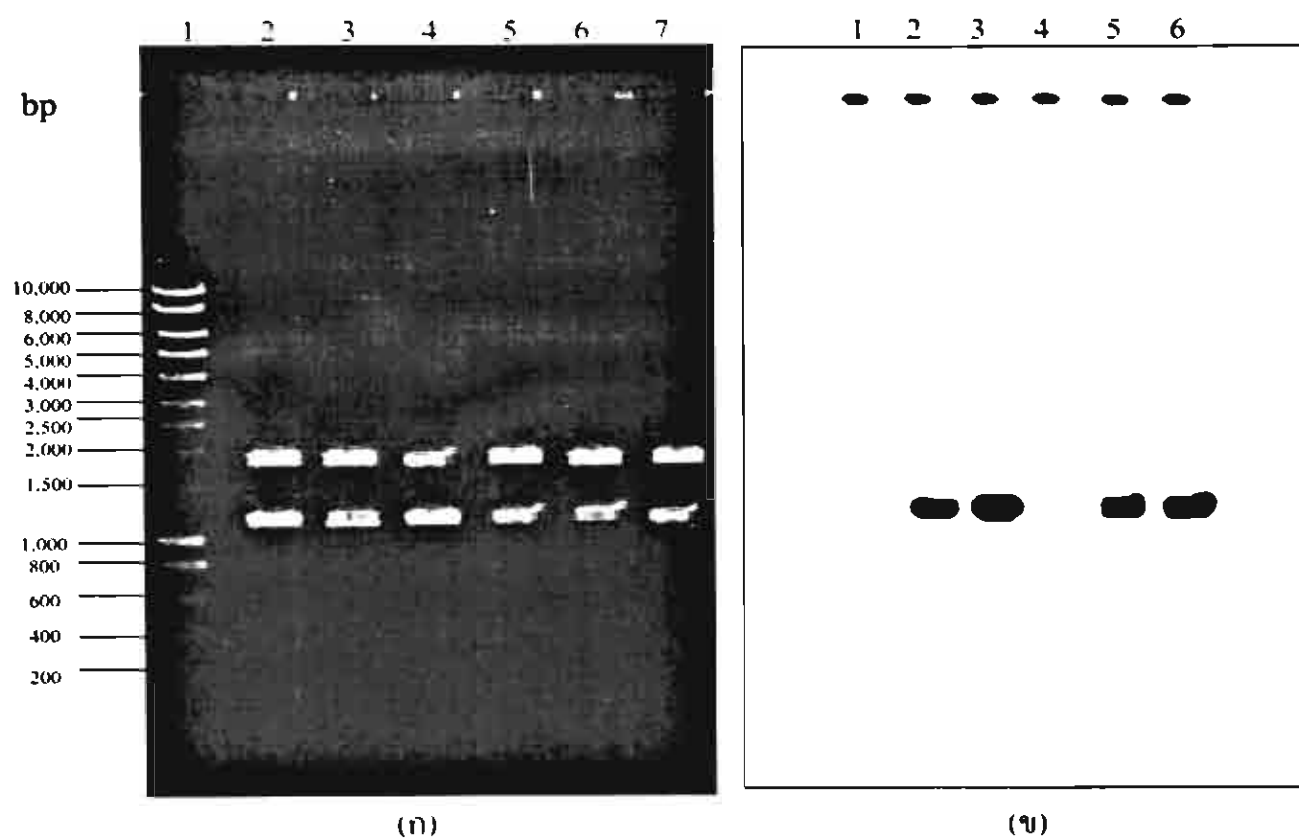
Lane 2-4: RNA จาการาก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: RNA จาการาก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) RNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 2 เดือน

Lane 1-3: RNA blotting gel จาการาก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: RNA blotting gel จาการาก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.27 RNA blotting gel ของโคตินีนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิอิการิ 105 อายุ 3 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

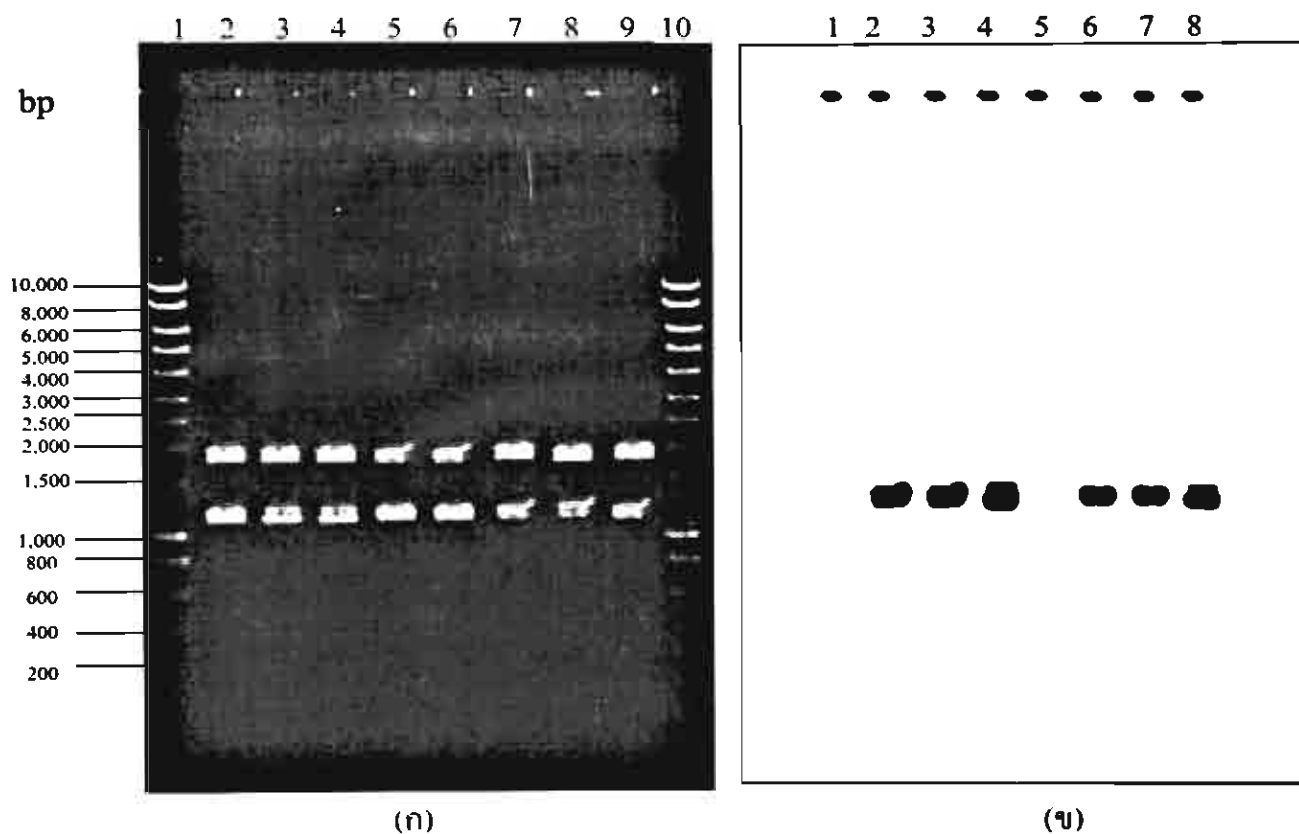
Lane 2-4: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ

(ข) RNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ อายุ 3 เดือน

Lane 1-3: RNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: RNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.28 RNA blotting gel ของไคตินเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิอิการิ 105 อายุ 4 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 10: Ladder I DNA maker

Lane 2-5: RNA จากรา ก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 6-9: RNA จากรา ก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ

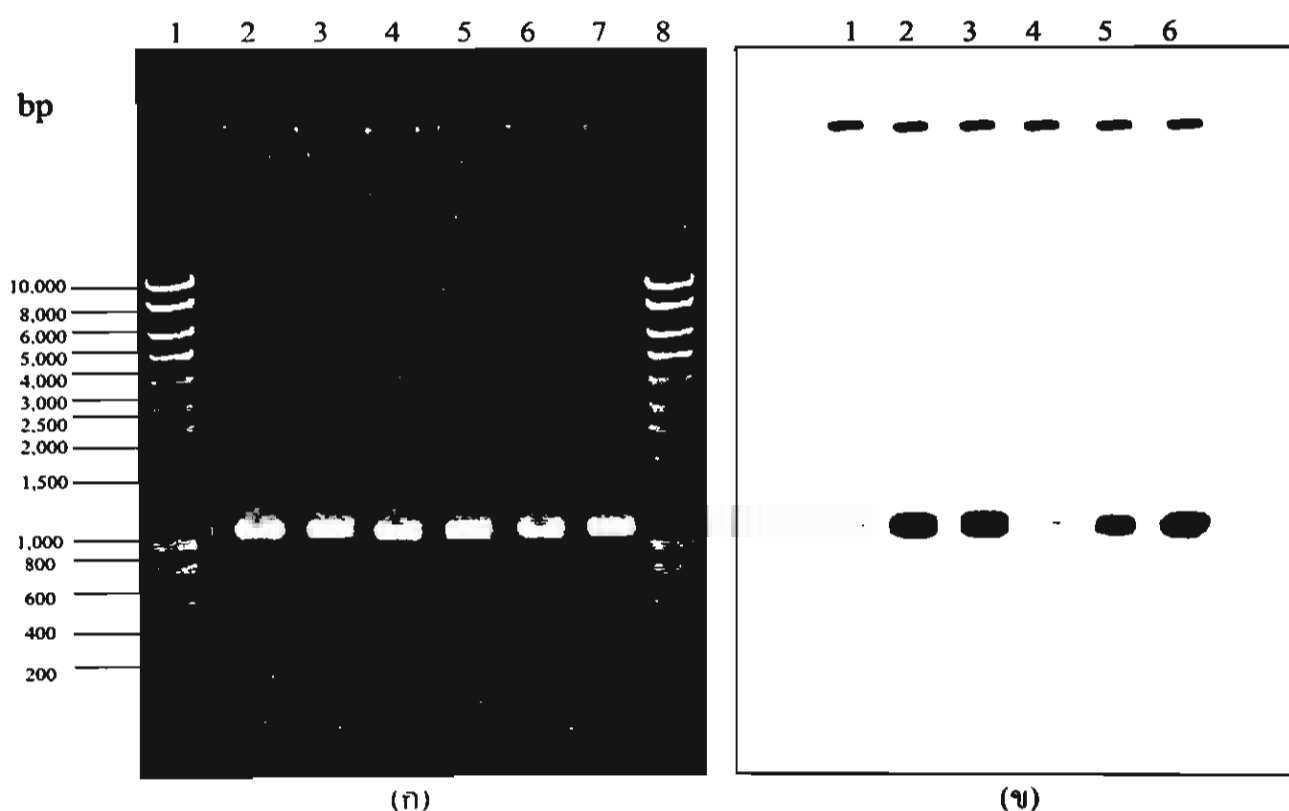
(ข) RNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ อายุ 4 เดือน

Lane 1-4: RNA blotting gel จากรา ก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-8: RNA blotting gel จากรา ก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยใช้วิธี Southern blot

ในนําราก ต้น และใบ ของข้าวที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ที่ถูกถ่ายยีนไคติเนส เมื่อสกัด RNA แล้วนำไปไฮบริไดเซชันกับ probe ที่เตรียมมาจาก DNA ของไคติเนส เพื่อตรวจสอบการแสดงออกมียีนไคติเนสขนาดประมาณ 1,100 bp ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว พบว่ามีการแสดงออกทุกบริเวณ คือในราก ต้น และใบ จากข้าวอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน รวมทั้งในเมล็ด แต่ในรากจะมีการแสดงออกน้อยที่สุด ส่วนต้น ใบ และเมล็ดจะมีการแสดงออกมาก ดังภาพที่ 4.29-4.32



ภาพที่ 4.29 DNA blotting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 1 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

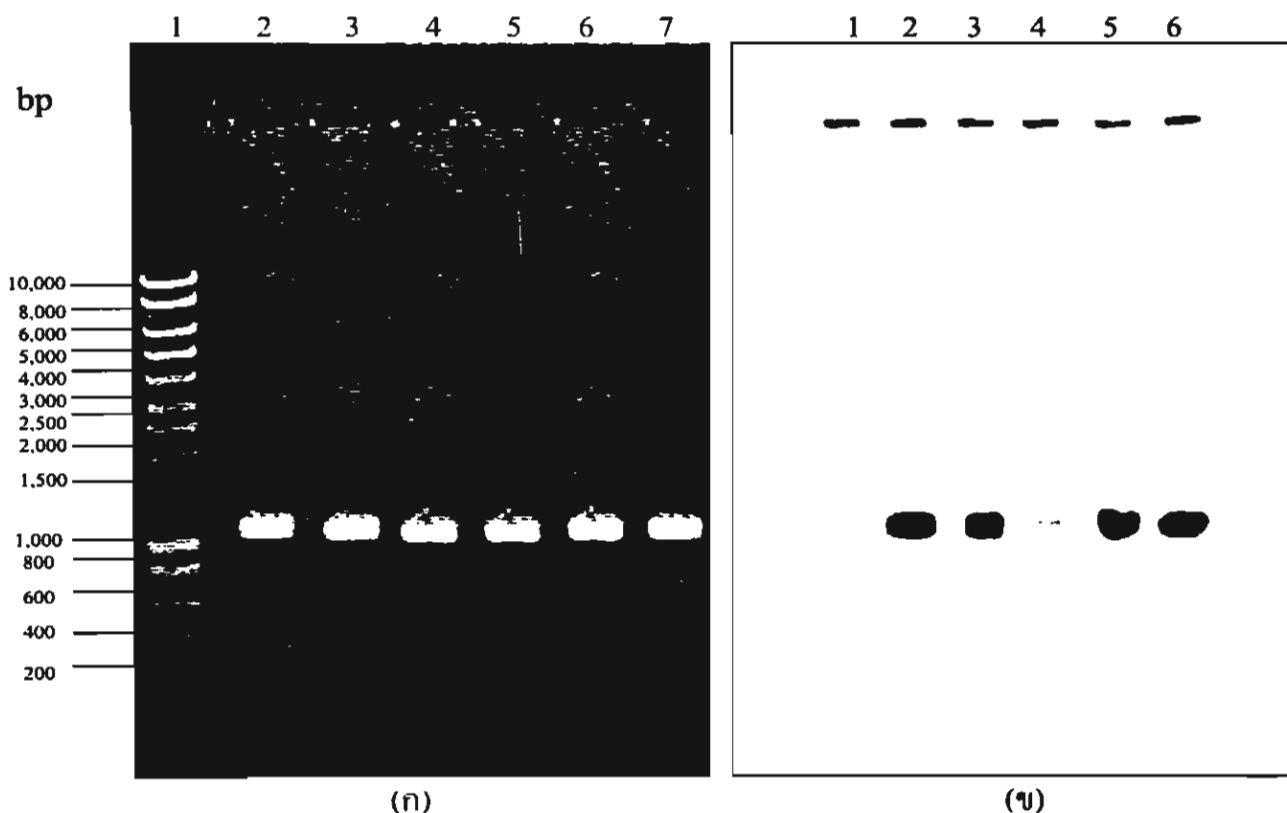
Lane 2-4: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 1 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-3: DNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: DNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.30 DNA blotting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิอิการิ 105 อายุ 2 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

Bam HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

Lane 2-4: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

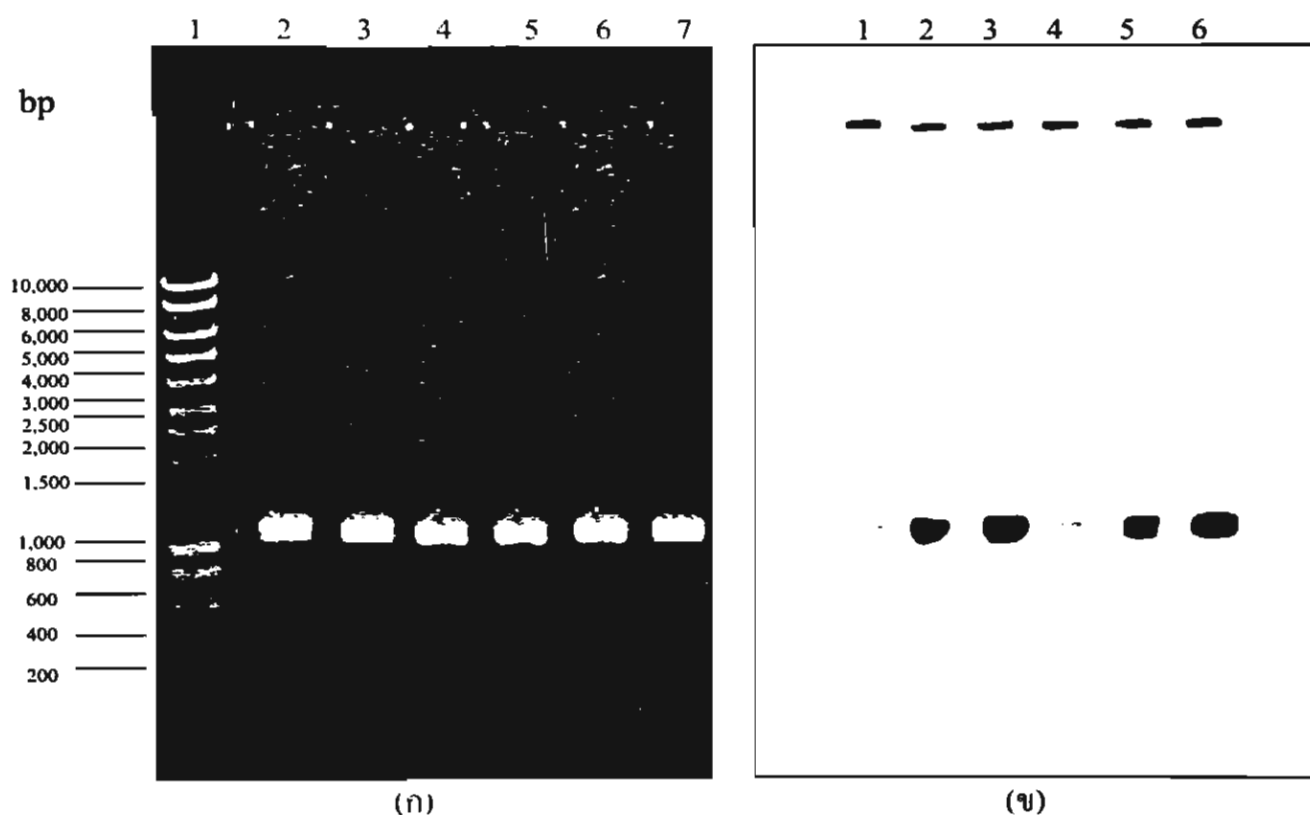
Lane 5-7: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ อายุ 2 เดือน ที่ถูกตัดด้วย

เอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-3: DNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: DNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิอิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.31 DNA blotting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 3 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

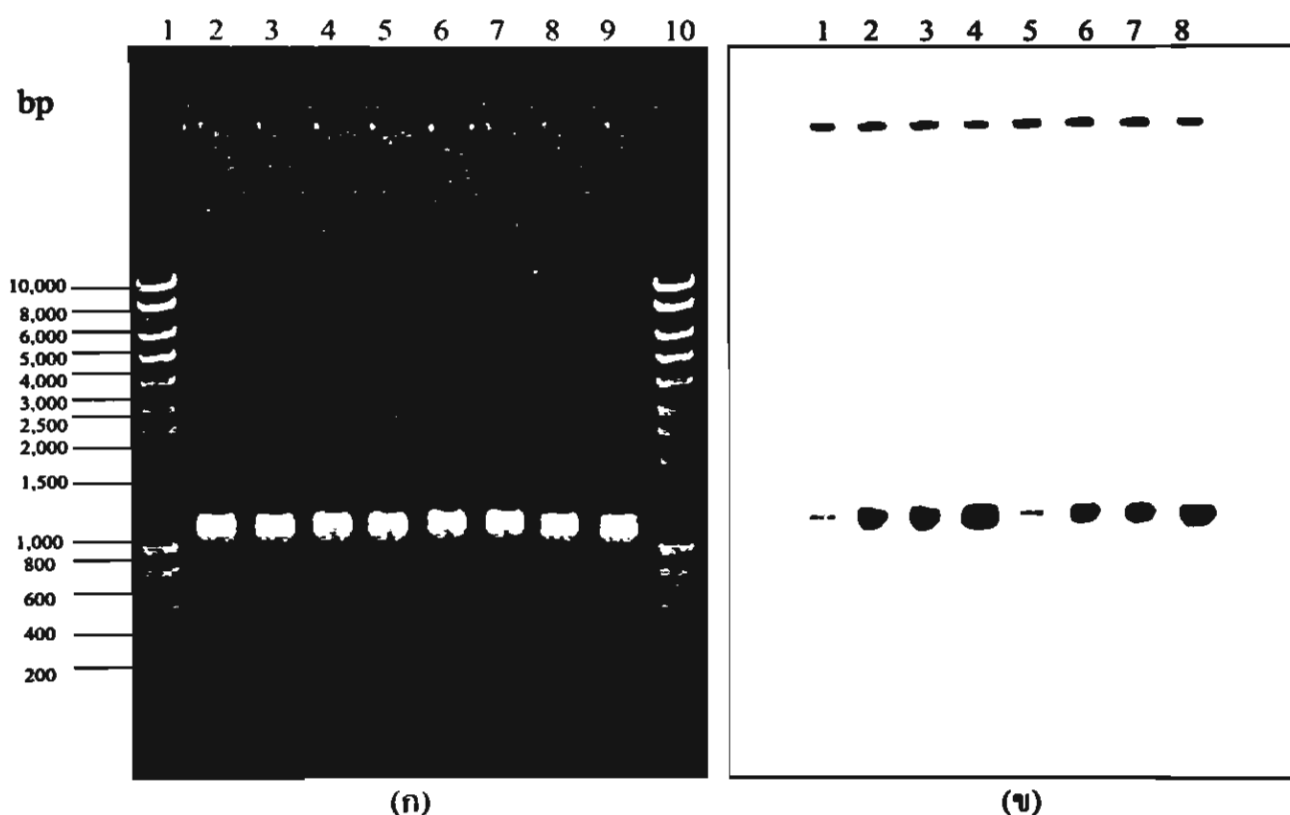
Lane 2-4: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA blotting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 3 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-3: DNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: DNA blotting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.32 DNA blotting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวคอกมะลิและข้าวโกชิจิการิ 105 อายุ 4 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 10: Ladder I DNA maker

Lane 2-5: DNA จากราก ต้นใบ และเมล็ดของข้าวคอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 6-9: DNA จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิจิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA blotting gel ของคอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจิการิ อายุ 4 เดือน ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-4: DNA blotting gel จากราก ต้นใบ และเมล็ดของข้าวคอกมะลิ 105 ตามลำดับ

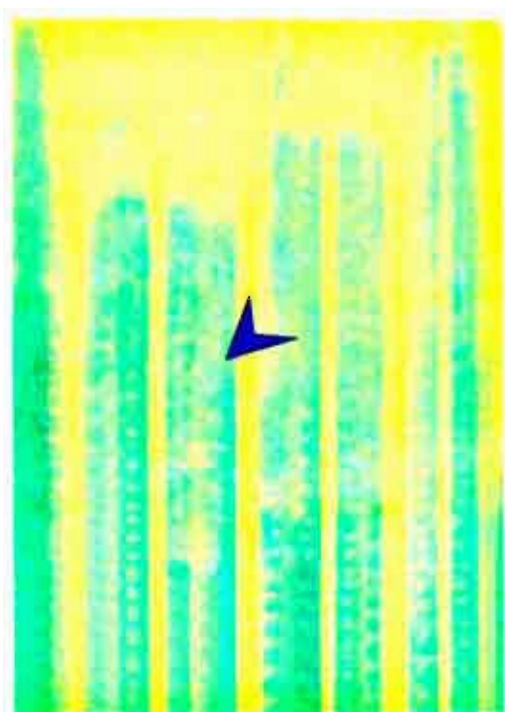
Lane 5-8: DNA blotting gel จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิจิการิ ตามลำดับ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยใช้วิธี *gus* assay

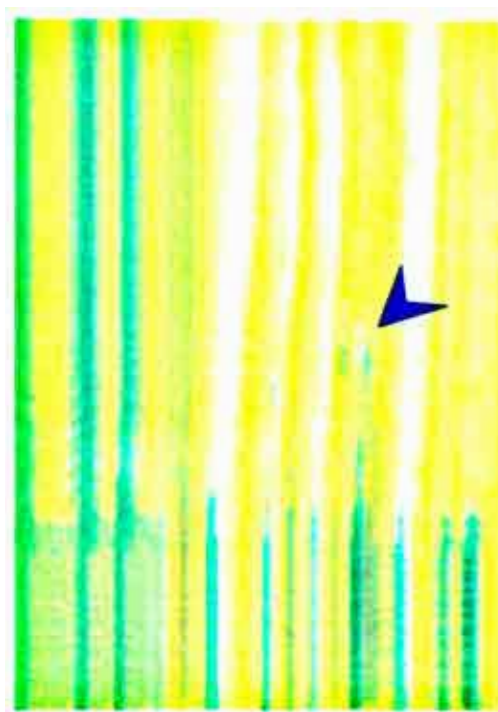
จากการตรวจสอบการแสดงออกในส่วนต่างๆ ของไคตินเนสในข้าวโดยการหา *gus* gene ที่มีในพลาสมิด pCAMBIA 1301 ซึ่งถ่ายลงไปในแคลลัสข้าว พบว่ามียีน *gus* ตั้งแต่เริ่มการถ่ายยีนเข้าแคลลัสทั้งข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจิการ์ โดยในแคลลัสของข้าวดอกมะลิ 105 จะมี *gus* gene ที่ชัดเจนกว่า ดังภาพที่ 4.33 ส่วนในใบ คั่น ราก และเมล็ด ของข้าวดอกมะลิ 105 ก็จะมี *gus* gene ชัดเจนและมากกว่า ในข้าวโกชิจิการ์ ดังภาพที่ 4.34 และภาพที่ 4.35



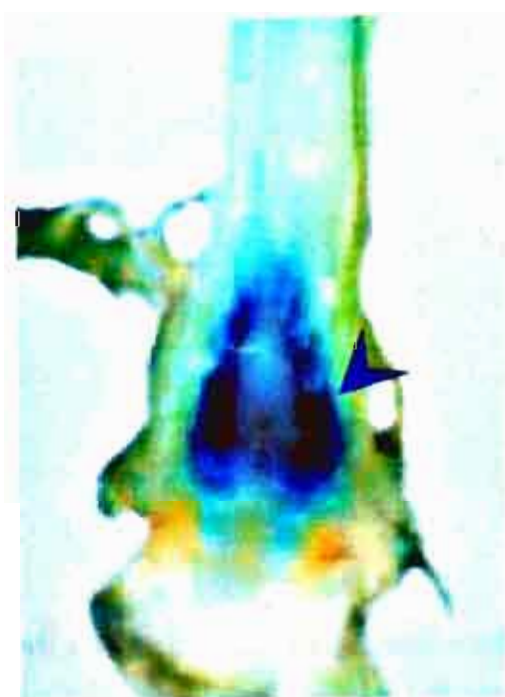
ภาพที่ 4.33 จุดสีน้ำเงินของ *gus* gene จากแคลลัสข้าวอายุ 1 เดือน ที่มีการถ่ายพลาสมิด control pCAMBIA 1301 (ก) แคลลัสจากข้าวดอกมะลิ 105 และ (ข) แคลลัสจากข้าวโกชิจิการ์



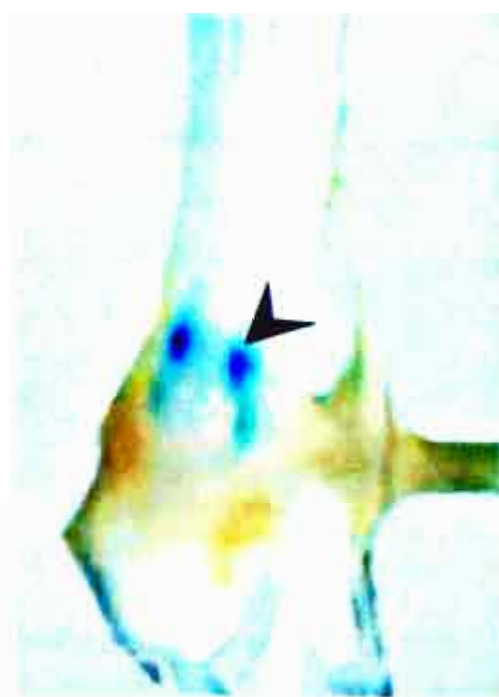
(ก)



(ข)



(ค)

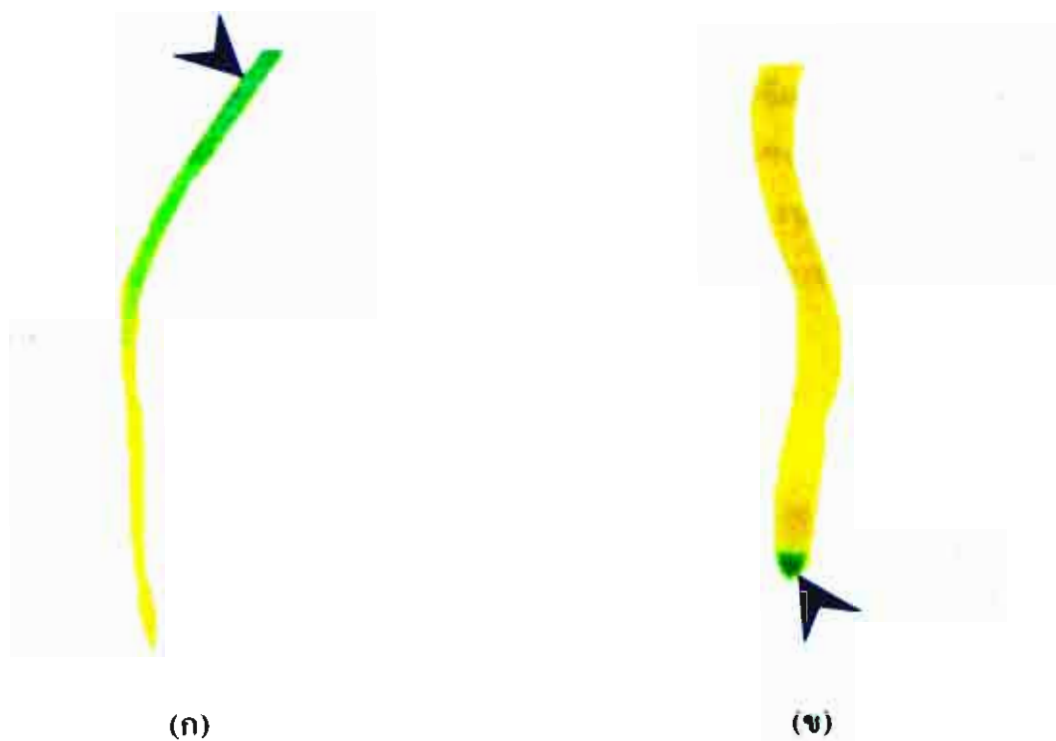


(ง)

ภาพที่ 4.34 จุดตีน้ำเงินของ *gus* gene จากส่วนของข้าวที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301

(ก) ใบของข้าวดอกมะลิ 105 อายุ 4 เดือน และ (ข) ใบของข้าวโกจิอิการิ อายุ 4 เดือน

(ค) รากของข้าวดอกมะลิ 105 อายุ 4 เดือน และ (ง) รากของข้าวโกจิอิการิ อายุ 4 เดือน



ภาพที่ 4.35 จุดที่นำเงินของ *gus gene* จากส่วนของข้าวที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301

(ก) รากของข้าวคอกมะติ 105 อายุ 4 เดือน และ (ข) รากของข้าวโกธิการิ อายุ 4 เดือน

(ค) เมล็ดของข้าวคอกมะติ 105 อายุ 4 เดือน และ (ง) เมล็ดของข้าวโกธิการิ อายุ 4 เดือน

การต้านทานเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ของต้นข้าว

จากการที่นำเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* มาฉีดพ่นบนต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจิการ์ที่มีอายุ 4 เดือน เปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้มีการฉีดพ่นเชื้อรา ดังภาพที่ 4.36 พบว่า ต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจิการ์ จะเริ่มมีใบสีเหลืองจากจากฉีดพ่นเชื้อราไป 3 วัน จากต้นข้าวดอกมะลิ 105 และต้นข้าวโกชิจิการ์ใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวตายในที่สุด ภายใน 14 วันและ 10 วัน ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.37



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.36 ต้นข้าวก่อนการฉีดพ่นเชื้อรา (ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิจิการ์



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.37 ต้นข้าวหลังการฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน
(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ยังไม่ได้พ่นเชื้อรา (ข) ข้าวดอกมะลิ 105 ที่พ่นเชื้อรา



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.38 ต้นข้าวหลังการฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน
(ก) ข้าวโกชิอิการิ ที่ยังไม่ได้พ่นเชื้อรา (ข) ข้าวโกชิอิการิ ที่พ่นเชื้อรา

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การเจริญของแคลลัสเป็นราก และต้นของข้าวดอกมะลิ 105 เท่ากับ 97.5, 86.75 และ 74.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเป็นรากและต้นของข้าวโกซิกิการีนั้นมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าคือ เท่ากับ 82.41, 73.25 และ 63.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. เปอร์เซ็นต์ของการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301 เข้าไปในข้าวดอกมะลิ 105 สูงกว่าข้าวโกซิกิการีคือ เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ. ในการเกิดราก ส่วนการเกิดต้นสีเขียวเท่ากับ 36 และ 26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3. เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีนไคตินเนสสู่ข้าวดอกมะลิ 105 สูงกว่าข้าวโกซิกิการีคือ เท่ากับ 54.67 เปอร์เซ็นต์ และ 42.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการเกิดราก ส่วนการเกิดต้นสีเขียวเท่ากับ 30 และ 22 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการถ่ายพลาสมิด 1300+chitinase มีเปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยกว่าการใช้พลาสมิด 1301 อาจเป็นเพราะว่า พลาสมิด pCAMBIA 1300 +chitinase มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pCAMBIA 1301

4. จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคตินเนสและยีน gus โดยวิธี Northern blot gel, Southern blot gel และ gus assay พบว่าการแสดงออกของไคตินเนสในข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกซิกิการี จะมีการแสดงออกในทุกๆ ส่วนของข้าวทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีการแสดงออกน้อยที่สุดในราก ส่วนใน ใบ ลำต้น และเมล็ดจะมีการแสดงออกของยีนไคตินเนสและยีน gus มาก แสดงว่ายีนไคตินเนสจะมีในใบ ต้น และเมล็ดมากกว่าในราก และในข้าวดอกมะลิ 105 จะมีการแสดงออกมากกว่าในข้าวโกซิกิการี ซึ่งจะเหมือนกับงานวิจัยของลี และคณะ (Li, et. al., 1992) ที่พบว่าข้าวอินดิกาจะมีการแสดงออกของ gus มากที่สุด ซึ่งมากกว่าจาปอนิกาและกลาเบอริมา ถึง 2-3 เท่า

5. การเกิดโรคของเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ในต้นข้าวทั้งข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกซิกิการี ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นปรากฏว่าต้นข้าวที่ได้รับการสเปรย์เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนั้นสองวันต้นข้าวมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเหลือง และเมื่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ต้นข้าวเหี่ยว ใบเกิดจุดสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ไม่มียีนของไคตินเนส จะไม่สามารถต้านทานเชื้อรา จึงทำให้เกิดโรคเชื้อราในข้าวได้

ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่น หรือเป็นพืชเศรษฐกิจเช่น ฝ้าย ปาล์ม หรือนำมาใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อม เช่น พุทธรักษา

5.2.2 นำอินทรีย์เข้าในข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจากิเพื่อศึกษาอินทรีย์เพิ่มเติม เช่น อินทรีย์วิตามิน อินทรีย์ทานความแล้ง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ประภา ศรีพิจิตร. (2532). การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยาศาสตร์เกษตร 28: 324-33.
- สนธิชัย จันทน์เปรม ชัยกฤษ มณีพงษ์ และอรดี สหวัชรินทร์. (2528). การคัดข้าวทนเค็มโดยวิธีเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. ในรายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 23 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ : 1-10.
- อุดม นวพานิชย์ และ อรดี สหวัชรินทร์. (2523). การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว. ในเรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 18 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ : 17.
- Abel, T., and Futsuhara, Y. (1985). Efficient plant regeneration by embryogenesis from root callus tissue of rice (*Oryza sativa* L.) J. Plant Physiol. 121, 111-118.
- Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., and Posee, R.D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology 202: 586-605.
- Balconi, C., Perugini, I., Castelletti, S., Reali, A., Russo, S., Chan, M.T., and Lupotto, E. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) Italian cultivars. Interaction among *Agrobacterium* strain and rice genotype in embryogenic callus of somatic and gametic origin. J. Genet. Breed. 52, 313-323.
- Beintema, J.J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. FEBS Letters 350: 159-163.
- Boissot, N., Valdez M., and Guiderdoni, E. (1990). Plant regeneration from leaf and seed-derived calli and suspension cultures of the African perennial wild rice, *Oryza longistaminata*. Plant Cell Reports . 9, 247-250.
- Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu Rev Phytopath 28: 113-138.
- Boller, T. (1987). Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Kosuge T., Nester E.W. (eds) Plant-Microbe Interactions, vol 2. Molecular and Genetic Perspectives, pp. 385-413. Macmillan, New York.

- Boller, T. (1988). Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. In **Surveys of plant Molecular and Cell Biology**, Volume 5 (Miflin, B. J., ed.). Oxford: Oxford University Press, pp. 145-174.
- Chagolla, A., Opedraza, M., and Lopez-Romero, E. (1987). Chitinolytic activity in cell-free extracts from mycelial cells of *Mucor rousii*. **Rev. Mex. Microbiol.** 3: 283-292.
- Chan, M.T., Lee, T.M., and Chang, H.H., Tse-Min, L., and Hsin-Hsiung, C. (1992). Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by *Agrobacterium tumerfaciens*. **Plant Cell Physiol** 33, 577-583.
- Chu, C.C., Wang, C.S., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chy, C.Y., and Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for antherculture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. **Sci. Sinica.** 18, 959-668.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, I.D., Nieler, K.K., Rasmussen, U., and Vad, K. (1993). Plant chitinases. **Plant J.** 3: 31-40.
- Cornejo-Martin, M.J., and Primo-Millo, E. (1981). Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.) **Euphytica** 30, 541-546.
- Dun-Yi., and Krikorian, A.D. (1981). Multiplication of rice (*Oryza sativa* L.) from aseptically culture nodes. **Ann. Bot.** 48, 255-259.
- Erik, J., Henk, T., Jeroen, S.C. van R., Sandra, A. Bres-V., Ilma, D., Peter, J.M. van den E., Ben, J.C.C., and Leo, S.M. (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica** 85: 173-180.
- Hakala, B.E., White, C., and Recklies, A.D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. **J. Biol. Chem.** 268: 25803-25810.
- Hartke, S., and Lorz, H. (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration from various indica rice genotype (*Oryza sativa* L.) **J. Genet. Breed.** 43, 205-214.
- Henrissat, B. (1990). Weak sequence homologies among chitinases detected by clustering analysis. **Protein Sequences Data Anal.** 3: 523-526.

- Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 293: 781-788.
- Humphreys, A.M., and Gooday. G.W., (1984). Phospholipid requirement of microsomal chitinase from *Mucor mucedo*. **Curr Microbiol.** 11: 187-190.
- Jakopitsch, C., Ruker, F., Regelsberger, G., Dockal, M., Peschek, G.A., and Obinger, C. (1999). Catalase-peroxidase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: cloning, overexpression in *Escherichia coli*, and kinetic characterization. **Biol. Chem.** 380(9): 1087-1096.
- Kaomek, M. (2002). Cloning, Expression, and Usage of Chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit. Ph. D. Thesis. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Kramer, K.J., Corpuz, L., Choi, H.k., and Muthukrishne, S. (1993). Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 23: 691-701.
- Leah R., Tommerup H., Svendsen I., and Mundy J. (1991). Biochemical and Molecular characterization of three barley seed proteins with anti-fungal properties. **J. Biol. Chem.** 266: 1564-1573.
- Li, X.Q., Liu, C.N., Ritichie, S.W., Peng J.Y., Gelvin S.B., and Hodges, T.K. (1992). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of gus A in rice. **Plant Mol. Biol.** 20, 1037- 1048.
- Linthorst, H. J. M., (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** 10: 123-150.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A., and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and Characterization of two chitinases and two 1,3- glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiol.** 87: 325-333.
- Menis, F.Jr, Fritig, B.J., Linthorst, H.J.M., Mikkelsen, J.D., Neuhaus, J.M., and Ryals, J. (1994). Plant chitinase genes. **Plant Mol. Biol. Rep.** 12: S22-S28.
- Morgavi, D.P., Sakurada, M., Tomita, y., and Onodera, R. (1994). **Microbiology** 140: 631-636

- Samac, D.A., Mohnen, D.M., and Menis, F., (1991). Developmental and pathogen induced activation of the Arabidopsis acidic chitinase promoter. **Plant Cell** 3: 1063-1072.
- Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli U., and Boller T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature** 324: 365-367.
- Urashibara, S., Tazawa, Kawakishi Y., Kobayashi, M., and Wakasa, K. (2001). Efficient Transformation of Suspension-culture Rice Cell Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Breed Science**. 51, 33-38.
- Vajrabhaya, M., Tunvachkul., and Vajabhaya, T. (1986). Effect of auxin and cytokinin of plant regeneratio from rice callus. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 11, 113-115.
- Wu, L., and Li, H.W. (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.
- Yatazawa, M., Furuhashi, K., and Shimizu, K. (1967). Growth of callus tissue from rice-root in vitro. **Plant Cell Physiol.** 8, 363-373.
- Ye-Yen, Z. and Zamir, K.P. (1994). Induction and characterization of chitinas cucumber (*Cucumis sativus* L.): effect of elocitors, wounding and pathoge **Plant Science**. 99: 141-150.
- Zimmy, J., and Lorz , H. (1986). Plant regeration and initiation of all suspension from root-tip derived callus of *Oryza sativa* L. (rice). **Plant Cell Reports**. 5, 89-92.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. อาหารเหลว LB-broth/L

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม

2. อาหารแข็ง LB-plate/L

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

3. AB medium

	(mg/L)
K_2HPO_4	1,500
NaH_2PO_4	200
NH_4Cl	1,000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	300
KCl	150
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5
Glucose	5,000
Agar	1,500
Adjust pH 7.2	

Autoclave at 121 °C for 20 min

4. AAM medium

AA macronutrients	mg/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
KCl	3,000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
AA micronutrients	mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
H_3BO_3	3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0387
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.75
AA iron Fe	mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28
AA Vitamin	mg/L
Myo-Inositol	100
Nicotin acid	0.5
Pridoxin HCl	0.5
Thiamin HCl	0.5
AA amino acid	mg/L
L-Glycine	7.5
L-Arginine	174
L-Glutamine	876
Casamino acid	500
Sucrose	68,500
Glucose	35,000
Adjust pH 5.2	
Autoclave 120°C for 20 min. Add acetocyringone 100 µM	

5. NB medium

Solution N6 Macronutrients	mg/L
KNO ₃	2,830
(NH ₄)SO ₄	463
KH ₂ PO ₄	460
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
Solution B5 micronutrients	mg/L
KI	0.75
H ₃ BO ₃	3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
MnSO ₄ ·7H ₂ O	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Solution FeEDTA	mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3
Solution B5 Vitamin	mg/L
Myo-Inositol	100
Nicotin acid	1
Pridoxin HCl	1
Thiamin HCl	10
Amino acid	mg/L
Casein hydrolysate	300
L-Proline	500
L-Glutamine	500
Sucrose	30,000
Agar	8,000

Adjust pH = 5.8

6. 2NB medium (calli induction medium)

Solution N6 Macronutrients	mg/L
KNO ₃	2,830
(NH ₄)SO ₄	463
KH ₂ PO ₄	460
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
Solution B5 micronutrients	mg/L
KI	0.75
H ₃ BO ₃	3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
MnSO ₄ ·7H ₂ O	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Solution FeEDTA	mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3
Solution B5 Vitamin	mg/L
Myo-Inositol	100
Nicotin acid	1
Pridoxin HCl	1
Thiamin HCl	10
Amino acid	mg/L
2,4-D	2
Casein hydrolysate	300
L-Proline	500
L-Glutamine	500
Sucrose	30,000
Agar	8,000

7. 2NB-AS medium (co-cultivation medium)

2NB media supplemented with

sucrose	30 g/L
glucose	10 g/L
autoclave 121 °C for 15 min	
add acetosyringone 100 µM	
pH 5.2	

8. R₂ medium

R ₂ macro element	mg/L
KNO ₃	2,830
(NH ₄)SO ₄	463
KH ₂ PO ₄	460
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
R ₂ micro element	mg/L
H ₃ BO ₃	2.83
MnSO ₄ ·7H ₂ O	1.6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0.125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.195
Solution FeEDTA	mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	12.5
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.7
LS Vitamin	mg/L
Thiamin HCl	1

9. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme*

ชั่ง Potato Dextrose Agar 39 กรัม ต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. การเตรียมสารละลาย Dioctyl sulfosuccinate

เตรียมสารละลาย Dioctyl sulfosuccinate เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชั่งสาร 1.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

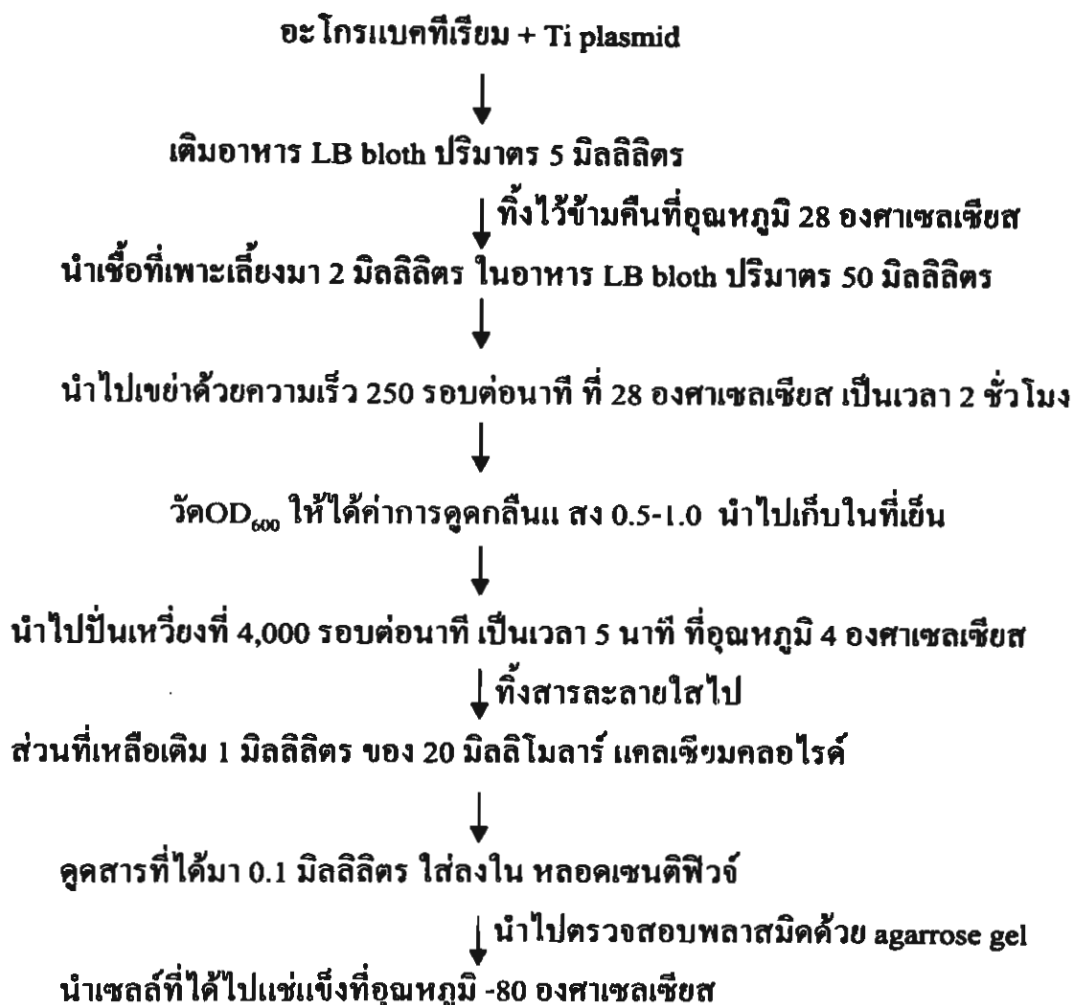
11. การเตรียมสารละลาย gus

เตรียมสารละลายปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยผสมสารต่อไปนี้

0.1 M NaH ₂ PO ₄	5 มิลลิลิตร
0.1 M NaH ₂ PO ₄	5 มิลลิลิตร
10% Triton X-100	0.5 มิลลิลิตร
0.025 M Potassium fericyanide	1 มิลลิลิตร
0.025 M Potassium ferrocyanide	1 มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร	50 มิลลิลิตร
เติม X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) 25 มิลลิกรัม	

12. การเตรียม Competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย

นำอะโกรแบคทีเรียที่บรรจุ Ti plasmid ที่ถูกควบคุมอย่างเหมาะสมมาใส่ในอาหารสูตร LB broth 5 มิลลิลิตร ที่งัวข้ามคืนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงข้ามคืนมา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารสูตร LB broth 50 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีที่ 28 องศาเซลเซียส (ประมาณ 2 ชั่วโมง) แล้วนำไปวัดที่ OD₆₀₀ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.5-1.0 เติมน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เติสารละลายไอทิง แล้วนำตะกอนไปเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน prechilled eppendorf test tubes นำเซลล์ไปแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส



13. อีดีทีเอเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ซังโคโซเดียมอีดีทีเอ (disodium ethylenediaminetetraacetic acid, dihydrate; MW 372.2 กรัมต่อโมล)หนัก 186.1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำให้ละลายโดยแท่งกวนแม่เหล็ก แล้วปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น หรือเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยวัดปริมาตร และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

14. TE saturated phenol (pH9.0)

TE (pH 8.0)	300	มิลลิลิตร
Melted Phenol at 50°C	300	มิลลิลิตร
8-Hydroxyquinoline	4.5	กรัม
ผสมให้เข้ากันและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน เทสารละลายข้างบนทิ้ง		

15. การเตรียม competent cell ของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* DH5 α

Streak DH5 α on LB plate



Transfer single colony to 3 ml of SOB(or LB) and growth at 37 $^{\circ}$ C for 14 h.



Transfer 1 ml of culture into 100 ml of SOB flask (size 500 ml)



Growth at room temperature and shaking about 55-70 rpm until OD=0.5 (about 10 h.)



Transfer into sterile centrifuge tube (autoclave)

Chill on ice for 10 min

Centrifuge at 3,000 rpm for 10 min at 4 $^{\circ}$ C



Discard supernatant

Resuspend cell in 5 ml of TB(ice cold) after add 10 ml of TB(total 15 ml)

Chill on ice at 4 $^{\circ}$ C for 10 min(ice + water)

Combine cell to one tube



Centrifuge at 3,000 rpm for 10 min at 4 $^{\circ}$ C



Discard supernatant

Resuspend cell in 8.37 ml of TB(ice cold) and add 630 μ l of dimethyl sulfoxide



Transfer 300 μ l of cell to eppendorf tube chill on ice



Store at -70 $^{\circ}$ C

16. การละลาย CH₃COOK เข้มข้น 3 โมลาร์ pH4.8

5 M CH₃COOK (510 g/l)

120 ml

Glacial acetic acid

23 ml

ปรับพีเอชเป็น 4.8 ด้วยกรดอะซิติกและปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

17. Stacking gel SDS-PAGE 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.0 M Tris (pH 6.8)	0.63 ml
dH ₂ O	3.4 ml
10% SDS	0.05 ml
30% acrylamide solution	0.83 ml
10% ammonium persulfate	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

18. สารละลาย SSC 20X

Sodium chloride	175.3 g
Sodium citrate	88.2 g
Distilled water	800 ml

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่

121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

19. Phenol / Chloroform

TE (pH 8.0)	300 ml
Melted Phenol at 50°C	300 ml
8-Hydroxyquinoline	4.5 g

เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืนเทของเหลวด้านบนออก แล้วเติมคลอโรฟอร์ม

300 มิลลิลิตร

20. TE 10 mM pH 8.0

Tris (10 mM)	0.121 g
EDTA (1 mM)	0.3722 g
water	80 ml

ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไป
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

21. 10 M LiCl (1 l)

LiCl	423.90 g
------	----------

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที

22. สารละลาย CTAB เข้มข้น 2X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

0.1 M Tris/HCl (pH 9.5)	1.21 g
-------------------------	--------

20 mM EDTA	7.44 g
------------	--------

1.4 M NaCl	8.19 g
------------	--------

ปรับปริมาตรเป็น 99 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที เติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

23. สารละลาย chloroform : Isoamylalcohol 24:1

Chloroform	960 ml
------------	--------

Isoamylalcohol	40 ml
----------------	-------

24. สารละลาย TAE เข้มข้น 10X

Tris	48.4 g
------	--------

Glacial acetic acid	11.42 ml
---------------------	----------

0.5 M EDTA (pH 8.0)	20.0 ml
---------------------	---------

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

25. สารละลายในการสกัด DNA (Gilbert buffer) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

0.5 M AcONH ₄	7.7 g
--------------------------	-------

10 mM MgCl ₂	0.41 g
-------------------------	--------

1 mM EDTA	0.07 g
-----------	--------

0.1 % SDS	0.29 g
-----------	--------

ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

26. DEPC treated water

เติม diethyl pyrocarbonate (DEPC) 0.1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าข้ามคืน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

27. LB plate

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

เติมน้ำ 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข



ภาพที่ ข.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)



ภาพที่ ข.2 ตู้อบ (hot air oven)



ภาพที่ ข.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow biohazard cabinet)



ภาพที่ ข.4 ตู้เพาะเมล็ดพันธุ์ (growth chamber)



ภาพที่ ข.5 เครื่องเขย่า (incubator shaker ; orbital)



ภาพที่ ข.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrometer)



ภาพที่ ข.7 เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker)



ภาพที่ ข.8 เครื่องชั่งตาร (balance)



ภาพที่ ข.9 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)



ภาพที่ ข.10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction; PCR)



ภาพที่ ข.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)



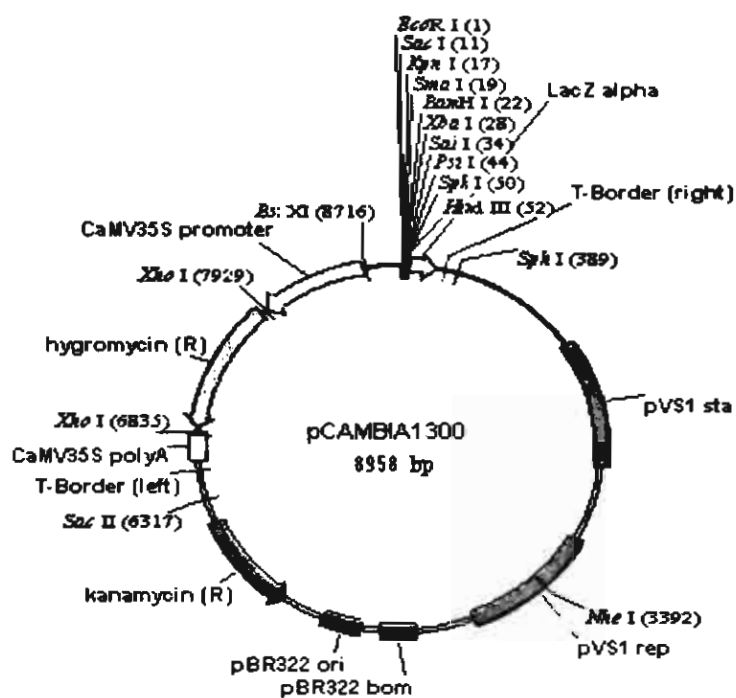
ภาพที่ ข.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (centrifuge)



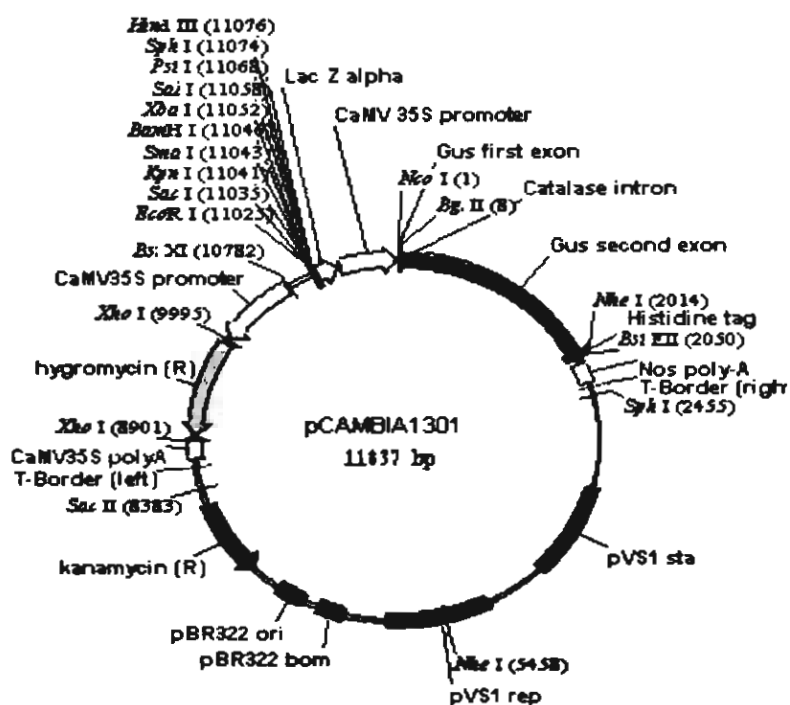
ภาพที่ ข.13 เครื่องแยกโปรตีนโดยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)



ภาพที่ ข.14 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)



ภาพที่ ข.15 พลาสมิด pCambia 1300



ภาพที่ ข.16 พลาสมิด pCambia 1300 + Chitinase

Output

จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

- ชื่อผู้แต่ง** Mana Kaomek and James Ketudat-Cairns
ชื่อเรื่อง Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Indica rice) and Japonica rice.
ชื่อวารสาร Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
รายละเอียด กำลังรอการตอบรับ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เิงพาณิชย์ ไม่มี

2.2 เิงนโยบาย ไม่มี

2.3 เิงสาธารณะ ไม่มี

2.4 เิงวิชาการ

- นำไปดัดแปลงในการทำวิจัยของนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท สาขาวิชาเคมี และชีววิทยาประยุกต์

3. อื่นๆ

3.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

- Kaomek, M. & Ketudat-Cairns, J.R. (2004). Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Khaw Dao Mali 105. In Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-21 October 2004. p. 33. Impact exhibition and Convention Centerl, Muang Thong Thani, Nonthaburi, Thailand.
- Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Indica rice) and Japonica rice. ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 9-11 มกราคม 2547. โรงแรมเฟลิกซ์ รีเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี.

3.2 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- ไปเสนอผลงานวิจัยในประเทศ ในการประชุมวิชาการ วทท. ครั้งที่ 30. ในระหว่างวันที่ 19-21 ตุลาคม 2547, ณ เมืองทองธานี จ.นนทบุรี

3.3 หนังสือ ไม่มี

3.4 การจดสิทธิบัตร ไม่มี

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

- Kaomek, M. & Ketudat-Cairns, J.R. (2004). **Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Khaw Dao Mali 105**. In Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-21 October 2004. p. 33. Impact exhibition and Convention Centerl, Muang Thong Thani, Nonthaburi, Thailand.

- **Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (*Indica* rice) and Japonica rice**. ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่พบเบชีวิจัย อาวุโส สกว. 9-11 มกราคม 2547. โรงแรมเฟลิกซ์ รีเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี.



บทคัดย่อ ABSTRACTS

การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30

19-21 ตุลาคม 2547

ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี

30th Congress on Science and Technology of Thailand

19-21 October 2004

Impact Exhibition and Convention Center , Muang Thong Thani



สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
THE SCIENCE SOCIETY OF THAILAND
UNDER THE PATRONAGE OF HIS MAJESTY THE KING



คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
FACULTY OF SCIENCE
SIRNAKAJEWIT UNIVERSITY

B

²Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phatumthani 12120, Thailand;

³Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; e-mail: sirawut@biotec.or.th

Abstract: RT-PCR was carried out for identification of sex-specific/differential expression in ovaries and testes of *P. monodon*. A 920 bp product specifically expressed in ovaries (PMscnDNA1) was cloned and sequenced. A primer pair was designed. RT-PCR still revealed a female-specific expression pattern of this marker. Polymorphism of PMscnDNA1 was found when representative individuals of *P. monodon* were genotyped. This newly isolated marker was then used to examine genetic diversity and differentiation of *P. monodon* from main fisheries in Thai waters (Satun, Trang, Phangnga, Chumphon and Trat). The number of alleles per locus and observed heterozygosity of PMscnDNA1 were 6 alleles and 0.3043 – 0.5128, respectively. High genetic diversity within geographic samples but low degrees of genetic differentiation between geographic samples was observed in this species.

B0031-ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GENE EXPRESSED IN OVARIES AND TESTES OF THE TROPICAL ABALONE *Haliotis asinina* BY cDNA SUBTRACTION

Piti Amparvut¹, Sirawut Klinbunga^{2*}, Anchalee Tassanakajon³, Takashi Aoki⁴, and Padermsak Jarayabhand^{5,6}

¹Program of Biotechnology, ²Department of Biochemistry, ³Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

²Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phatumthani 12120, Thailand.

⁴Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Tokyo 108-8477, Japan.

⁶Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
mail address: sirawut@biotec.or.th

Abstract: Subtractive cDNA libraries were established from ovaries and testes of the tropical abalone (*Haliotis asinina*). A total of 270 randomly selected clones were unidirectionally sequenced. Results indicated that 71 clones (64.5%) and 56 clones (35.0%) of ovary (forward subtraction) and testis (reverse subtraction) libraries were homologues of known transcripts. Sex-related transcripts were predominated and the most abundant transcript in ovaries and testes of *H. asinina* was VCP41 and sperm lysin ESTs, respectively. The full length of sperm lysin cDNA was obtained and first isolated in *H. asinina*. Expression of sex-related genes was further examined using RT-PCR. Female-specific expression was found from homologues of VCP1, VCP3, VCP7, VCP49 and VTG1.

B0032-ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FEMALE-SPECIFIC EXPRESSION cDNA MARKERS IN THE GIANT TIGER SHRIMP (*PENAEUS MONODON*)

Rungrapa Leelatanawit¹, Sirawut Klinbunga^{2*}, Padermsak Jarayabhand⁴ and Piamsak Menasveta²

¹Program of Biotechnology, ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand;

²Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), NSTDA 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phatumthani 12120;

⁴Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand; e-mail address: sirawut@biotec.or.th

Abstract: Subtractive cDNA libraries of ovaries of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) were constructed. A total of 1 clones were unidirectionally sequenced. Most of the expressed genes in ovaries encoded thrombospondin (TSP, 45 clones accounting for 28.7% of total expressed sequence tags, ESTs), peritrophin (17 clones, 10.6%) and unknown transcripts (76 clones, 49.7%). Gender-specific expression of candidate sex-linked gene homologues was examined by RT-PCR. While peritrophin was expressed in both ovaries and testes, a TSP homologue revealed sex-specific expression in ovaries but not in testes of *monodon*. Semi-quantitative PCR indicated significant differences in expression levels of TSP in 4-month-old and broodstock sized *P. monodon* ($P < 0.05$).

B0033-EXPRESSION OF CHITINASE FROM *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* DE WIT IN KHAO DAWK MAI 105

Mana Kaomek¹ and James R. Ketudat-Cairns²

¹Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Walailak University, Nakhon Phanom, Thailand

²School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Muang District, Nakhon Ratchasim, Thailand.

E-mail address: kaomek@mail.wvu.ac.th, cairns@ccs.sut.ac.th

B

Abstract: This research studied the expression of *Leucaena leucocephala* chitinase from Khao Dawk Mali 105. Plasmid was constructed by chitinase insertion into pCAMBIA 1300. It was compared with pCAMBIA 1301 contain a gus gene reporter gene under the control the 35s promoter. They were transformed into Khao Dawk Mali 105 calli by agrobacterium EHA 105 and grown on 2ND6. The percentage of calli Khao Dawk Mali 105 was 75.

B0034 Development of AFLP markers for fast-growing *Penaeus monodon*

APIRADEE RIENNUKOL, BUSABUN CHAISALEE and Kanokporn Triwitayakorn*

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, 73170, Thailand

* Correspondence to: Kanokporn Triwitayakorn, E-mail: mbktw@mahidol.ac.th

Abstract: The black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, is one of the most economically important aquaculture species in Thailand. Farming of *P. monodon* has been facing several problems especially out break of diseases, poor farming management and broodstock limitation, resulting decreasing of shrimp products. To overcome the problems, applications of molecular biology and genetic seem to be one of the promising methods. In this project, the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique was used to generate genetic markers that are specific to fast-growing and sex in the *P. monodon*. A total of 171 primer combinations of *EcoRI*-ANN/*MseI*-GNN and *EcoRI*-TNN/*MseI*-GNN were used to screen 151 day-old shrimp samples which were classified into four groups according to their body weight and sex. The results showed 24 markers were derived from large shrimp, 21 from small shrimp, 17 from female sex and 10 from male sex. All identified AFLP markers will be converted to SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker in order to improve efficiency of the markers for a large scale application in Marker Assisted Selection Program (MAS). Moreover, the AFLPs will be useful for construction of genetic linkage map of the *P. monodon*.

B0035-MORPHOLOGY AND PALYNOLOGY OF KALA (*ALPINIA NIGRA*) IN KOKRET, PAKKRET DISTRICT, NONTABURI PROVINCE

Kanokon Riwiang, Tian Kanpuy and Ratapol Sornprasert

Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Chandakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: Morphology of Kala (*Alpinia nigra*) in Kokret, Pakkret District, Nonthaburi Province found that Kokret community call it "Naw Kala". The Kala is a herbaceous plant, grows well on riverside and can grow on land. The underground stem is a rhizome while the aerial stem is pseudostem with approximately 3.08 meters in height. Leaf shape is oblong type. Inflorescence is penicle type with flowers bloom at the apices in floret has involucre bract constancy. The floret consists of three sepals are 3 lobes. It has three petals, which are white-green color and 3 lobes. The flat labellum is 4 lobes, light pink color. Placentation in the inferior ovary is axile placentation, which are 3 carpels. Simple fruit is berry. Ripe fruit is black, round-shape. Seed is dry - brown with white aril. Floral formula is $\Phi \bullet ca^{(1)} co^{(1)} s^1 p^3$. Palynology of Kala found that the pollen is monad, nonaperturate grain, with spheroidal shape, isopolar pole, inaperture, radial symmetry exine sculpturing is echinate.

B0036-Molecular cloning and identification of superoxide dismutase and arginine kinase variants in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.

Sansook Boonseub¹, Narongsak Puanglarp² and Piamsak Menasveta^{2,3}

¹Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phthumthani, 12120, Thailand

³Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

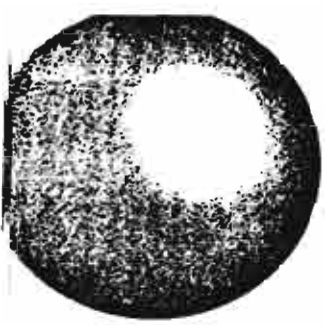
Abstract: Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that reduces the toxic of oxidation in living organisms. Arginine kinase (AK) is an enzyme that plays a critical role as energy reserve. The activities of these enzymes are related to oxidative and osmotic stress in marine animals. In this study, cloning and sequencing of Mn-SOD, Cu/Zn SOD and AK were conducted. The identification of different forms of these enzymes in different tissues was also carried out using single stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) technique. The result indicated that there were 4 variants of Mn-SOD while only 1 form of Cu/Zn-SOD and AK was observed. The complete DNA sequences from each form of these enzymes will be further determined. The result will help to develop primers more specific to each form of these enzymes. The activities of these enzymes can be measured and used as biomarkers for indication of stress condition in *Penaeus monodon*.

B0037-IDENTIFICATION OF SEX-SPECIFIC MARKERS FROM BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* USING GENOMIC DNA SUBTRACTION

Srisupaph Poonlaphdecha¹, Narongsak Puanglarp², Sirawut Klinbunga² and Piamsak Menasveta^{2,3}

¹Program of Biotechnology, ²Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

³Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phthumthani, 12120, Thailand



นักวิจัยรุ่นใหม่

WU

เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

วันที่ 9-11 มกราคม 2547
ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี



WU
คช
ทอ

239	ดร.มองเพ็ญ จิตอารีรัตน์	คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	pongphen.jit@kmutt.ac.th
240	ดร.พงศ์ธร ฐปะเดมิย์	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	pongthorn@engr.tu.ac.th
241	ผศ.ดร.พงศ์ราม รามสูต	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล	ponggrama@yahoo.com
242	ผศ.ดร.พยงค์ วณิกเกียรติ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	scpawt@mahidol.ac.th
243	ดร.พรเพ็ญ ทับเปลี่ยน	คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	nutsuda@swu.ac.th ptubplian@yahoo.com psrihan@hotmail.com prapapha@swu.ac.th
244	ดร.พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร	pornsak@su.ac.th
245	ดร.พรสวรรค์ กาญจนวนิชย์กุล	คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	kkpomsa@kmitl.ac.th
246	ดร.พรสวรรค์ พลอยแก้ว	คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	JAMHAIDAI@hotmail.com jamhaidai@hotmail.com
247	ดร.พัชนี วิจิตพันธุ์	คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	faaspnv@ku.ac.th
248	ดร.พัชรินทร์ แสงजारึก	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	patch@swu.ac.th saengjaruk@yahoo.com
249	ดร.พานิช วุฒิพฤกษ์	คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ	pnv@kmitnb.ac.th
250	ดร.พินท์สุตา วีรวัฒน์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ptusu@yahoo.com
251	ดร.เพ็ญศิริ ทองผดุงโรจน์	คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ	pensiri@kmitnb.ac.th
252	ผศ.พ.ท.มัทริฐ มุ่งถิ่น	วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า	mattrirut@pmk.ac.th
253	ดร.มณฑกรณ์ สุธีพัฒนานนท์	โรงเรียนกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยมหิดล	monsuteerawa@yahoo.com
254	ภญ.ดร.มัลลิกา ชมนาวัง	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	scmid@mahidol.ac.th
255	ดร.มานะ ชาวเมฆ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาการณ ในพระบรมราชูปถัมภ์	kaomek@mail.nipw.ac.th
256	ผศ.ดร.มานะ อมรกิจบำรุง	คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	mana.amo@kmutt.ac.th
257	ดร.เมธา รัตนการพิทักษ์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์	mrutnakd@hotmail.com
258	ดร.ไมตรี อินทร์ประสิทธิ์	คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	inprasitha@hotmail.com
259	ดร.ยุทธนา หมนันต์	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	myuttana@hotmail.com
260	ดร.ยุทธนา ดันติรุ่งโรจน์ชัย	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	yi203@hotmail.com scyyt@mahidol.ac.th
261	ดร.รัชดา เลือยงค์(เครสซี่)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ratchadasuaeyun@hotmail.com