



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแสดงออกของโคตินีนสจากกระถินบ้าน
ในข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ขาวเมฆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
จังหวัดปทุมธานี

30 เมษายน 2549



สัญญาเลขที่ MRG4680012

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแสดงออกของไคติเนสจากกระถินบ้าน
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. การตรวจสอบยีนไคติเนสในแคลลัสและส่วนต่างๆ ของข้าว	25
7. การทดสอบการต้านเชื้อราสายพันธุ์ <i>Fusarium moniliforme</i> ของต้นข้าว	35
บทที่ 4 ผลการวิจัย	36
สร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีนไคติเนสจากกระถินบ้าน	36
การศึกษากาการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกชิจิการให้เจริญเป็นแคลลัส	46
แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส	50
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยวิธี PCR	54
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยวิธี Northern blot	55
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยวิธี 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 ของข้าวโกธิฮิการิ	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 ต้นข้าวโกชิอิการิหลังการฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ <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 ไมโคโซมอล 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 มีการรักษาตำแหน่งของคะตะไลติกโดเมน (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 ถูกเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์ในขณะที่พืชได้รับเชื้อราที่เป็น 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. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสข้าวจากเมล็ดข้าวหอมมะลิไทย 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 พบครั้งแรกในท้องที่แหลมประจักษ์ อำเภอนนทบุรี จังหวัดชลบุรี โดย นายจรูญ ดันจวบ 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 พวงข้าวเจ้านาสวน ใว่ต่อช่วงแสง ต้นสูง 138 เซนติเมตร ทรงกอตั้ง ปล้องสีเขียว การล้มของลำต้นปานกลางใบ และกาบใบสีเขียว ใบมีขน ใบตรงตั้งตรง 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 เกษตรที่สำคัญข้อมูลอุณหภูมิตามวิทยาในช่วงฤดูปลูกตรวจสอบคุณภาพเมล็ดทางกายภาพและทางเคมี 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 การร่วงของเมล็ดยากมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 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 และกระแสไฟฟ้านั้น 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* ขั้วมดิสเกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ไม่สามารถตรึงในโครเจนจากอากาศได้ เป็นเชื้อที่อยู่ในดินอย่างอิสระหรืออยู่ในน้ำเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลล่า 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 พืชหลายชนิดเมื่อได้รับเชื้อมักจะเกิดโรครูปม (crown gall tumor) บนรากและลำต้น (ไพโรจน์, 2526) และจะสามารถแยกแบคทีเรียออกมาได้จากปุ่มมเหล่านี้แล้วจำแนกโดยเพาะเชื้อเข้าไปในพืชทดลอง (Veldstra, 1972)

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

ก. ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และเกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งสร้าง 3-ketolactose

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

(2.) ไม่ทำให้เกิดปุ่มม *A. radiobacter*

ข. ไม่ใช้กรดอะมิโน ไนเตรท และเกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งสร้าง 3-ketolactose

(1.) ทำให้เกิดรากฝอย *A. rhizogenes*

(2.) ทำให้เกิดปุ่มมบนรากเบอร์รี่ *A. rubi*

พลาสมิดใน *A. tumefaciens*

A. tumefaciens มีพลาสมิดขนาด 140-235 kilobases เรียกว่า Tumor-inducing หรือ Ti plasmid ตามลักษณะซึ่งสามารถทำให้พืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิดเกิด crown gall tumor คือพืชมีลักษณะเป็นปุ่มม และเนื้อเยื่อพืชเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อได้รับเชื้อผ่านบาดแผลบนต้นพืช (Willmitzer, et. al., 1982) แบคทีเรียไม่สามารถทำให้เกิดปุ่มมในพืชที่ไม่มีบาดแผล และการเกิดปุ่มมกับพืชจะขัดขวางการเจริญเติบโตของพืช หรือทำให้พืชตายเพราะจะไปรบกวนการหมุนเวียนของน้ำและอาหารในพืช (Hooykaas, and Schilperoort, 1984) เมื่อนำเนื้อเยื่อที่เป็นปุ่มมมาเลี้ยงในอาหารปราศจากเชื้อ 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 ซึ่งต่อมาทำให้เกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นปุ่มม 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 สควเทลาตัพพะที่ยังไม่เจริญเต็มที่ 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 กับรากที่มีอายุนานกว่า 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. Casmino 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-XPosureTM Film ขนาด 12.5X17.5 cm ยี่ห้อ PIERCE

41. 0.45 μ m 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

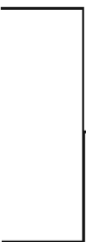
59. ข้าวโกชิการิ

วิธีการวิจัย

1. สร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มีอินโคติเนสจากกระถินบ้าน

1.1 นำพลาสมิด pUC19 ที่มีอินโคติเนสจากกระถินบ้านมาหาลำดับเบส (sequencing) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส

1.2 นำพลาสมิด pUC19 ที่มียีนไคตินเนสจากกระถินบ้านมา 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		

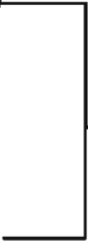
1.3 นำพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 6,150 bp

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

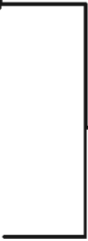
Plasmid pBI121	1 μ l		Incubate at 4°C overnight
DNA fragment	5 μ l		
10Xbuffer ligase	1 μ l		
H ₂ O	2.5 μ l		
T4 DNA ligase	0.5 μ l		
Total	10 μl		

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

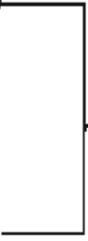
1.6 นำโคโลนีมาตรวจหายีนไคตินเนสในพลาสมิด pBI121 โดยสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I จะต้องมีแบนด์ขนาดประมาณ 1,100 bp ของ ยีนไคตินเนส และแบนด์ขนาดประมาณ 6,150 bp ของพลาสมิด pBI121

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		

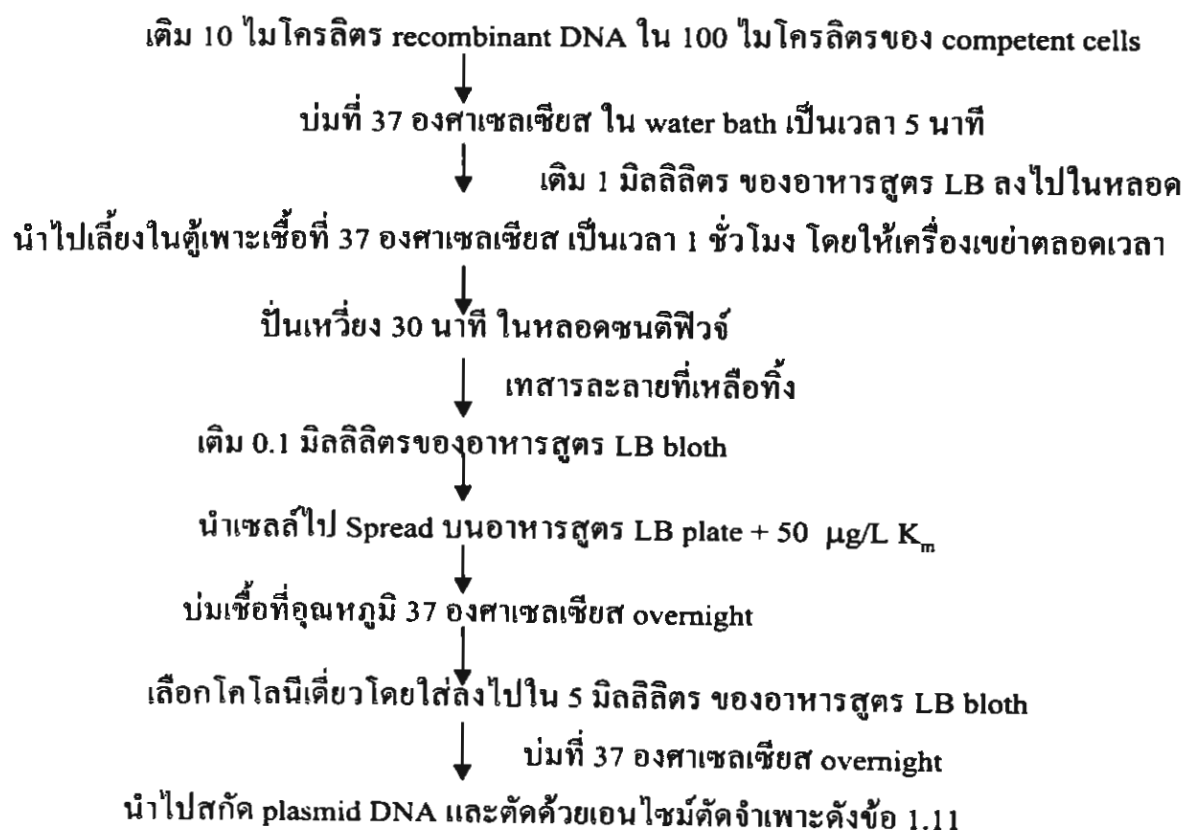
1.8 นำพลาสมิด pCAMBIA 1300 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI แล้วนำมา run ใน 5% polyacrylamide gel electrophoresis ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วย EtBr 15 นาที นำมาตัดแบนด์ขนาดประมาณ 8,958 bp

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

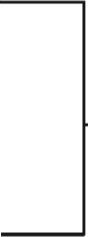
1.9 นำพลาสมิด pCAMBIA1300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI มาเชื่อมต่อกับ DNA fragment ขนาดประมาณ 2,206 bp ที่มี promoter CaMV35S ขนาด 870 bp ยีนไคตินเนส ขนาด 1,065 bp และ NOS ขนาด 271 bp โดยใช้เอนไซม์ T₄ DNA ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight

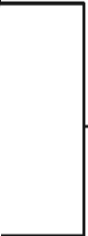
pCAMBIA1300	1 μ l		Incubate at 4°C overnight
DNA fragment	5 μ l		
10Xbuffer ligase	1 μ l		
H ₂ O	2.5 μ l		
T4 DNA ligase	0.5 μ l		
		Total	10 μ l

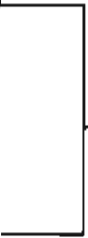
1.10 นำ recombinant DNA ที่ได้ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α บนอาหาร LB plate ที่มี kanamycin 50 mg/L เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส จนได้โคโลนีเกิดขึ้น

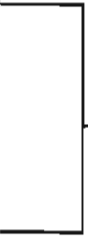


1.11 เลือกโคลนที่ได้มาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และ *Eco* RI, เอนไซม์ *Hind* III และ *Bam* HI, เอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I, เอนไซม์ *Sac* I และ *Eco* RI, เอนไซม์ *Bam* HI และ *Eco* RI จะได้แบนด์ขนาดประมาณ 2,206 bp ของ promoter CaMV35S + chitinase + NOS แบนด์ขนาด 870 bp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

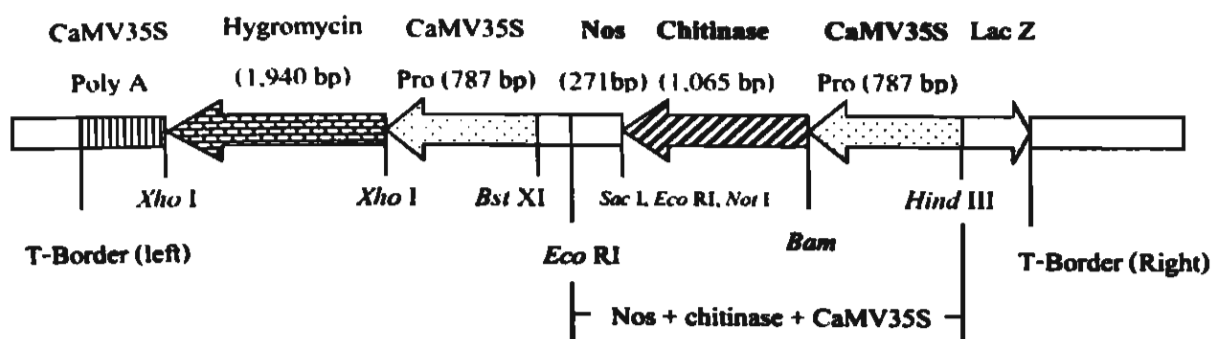
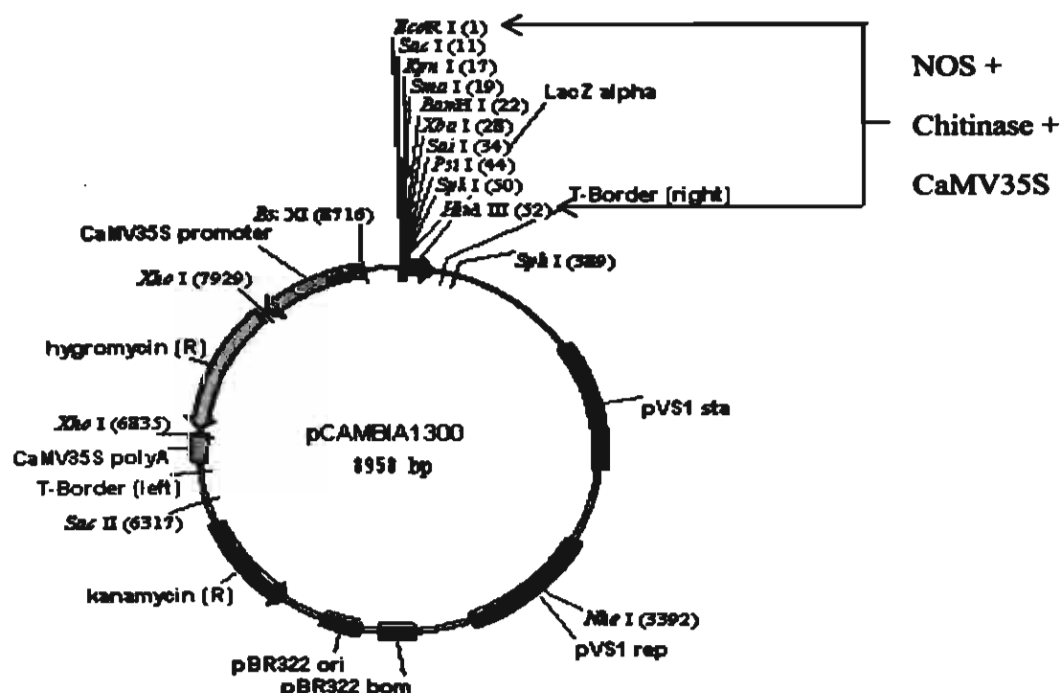
Plasmid 1300	5 µl (100 µg)		Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 µl		
H ₂ O	3 µl		
<i>Hind</i> III	0.5 µl		
<i>Eco</i> RI	0.5 µl		
Total	10 µl		

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		

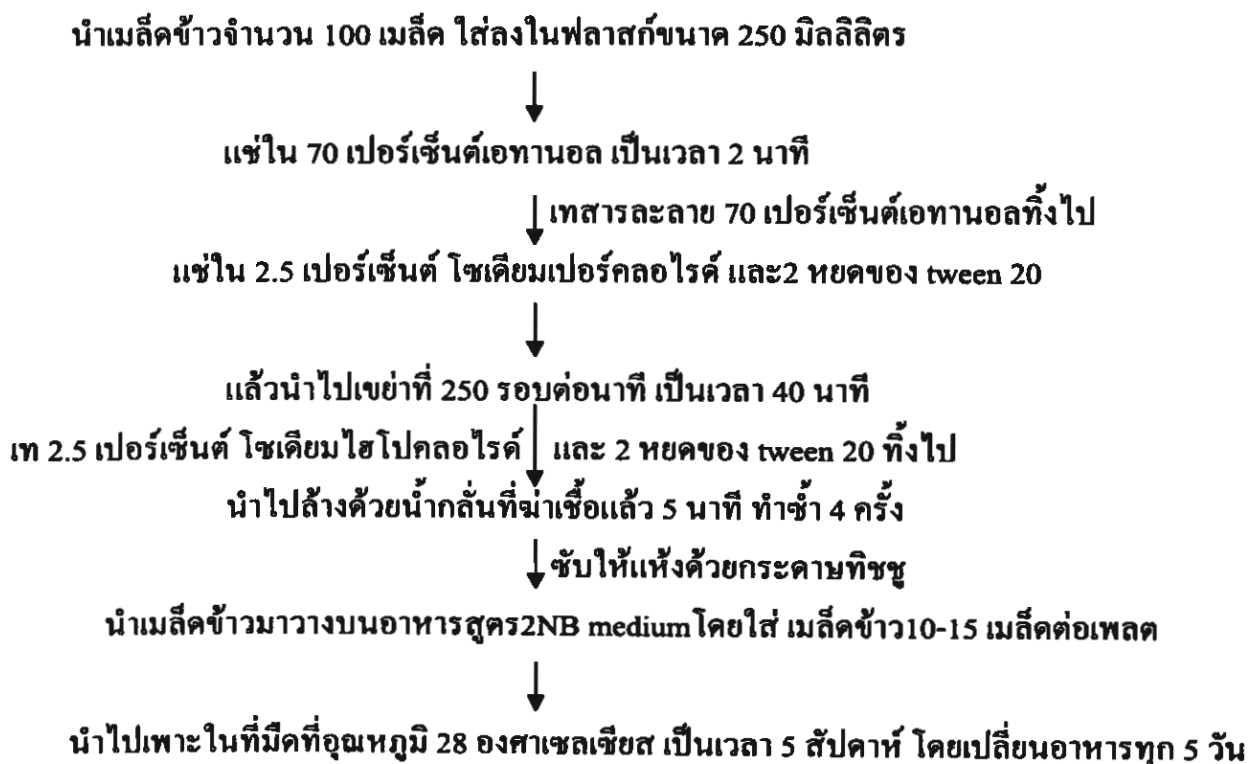
Plasmid 1300	5 μ l (100 μ g)	Incubate at 37°C overnight
10Xbuffer E	1 μ l	
H ₂ O	3 μ l	
<i>Bam</i> HI	0.5 μ l	
<i>Eco</i> RI	0.5 μ l	
Total	10 μl	



ภาพที่ 3.1 การสร้างพลาสมิด pCambia 1300 ที่มียีนไคตินเนส

2. การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดเป็นแคลลัส

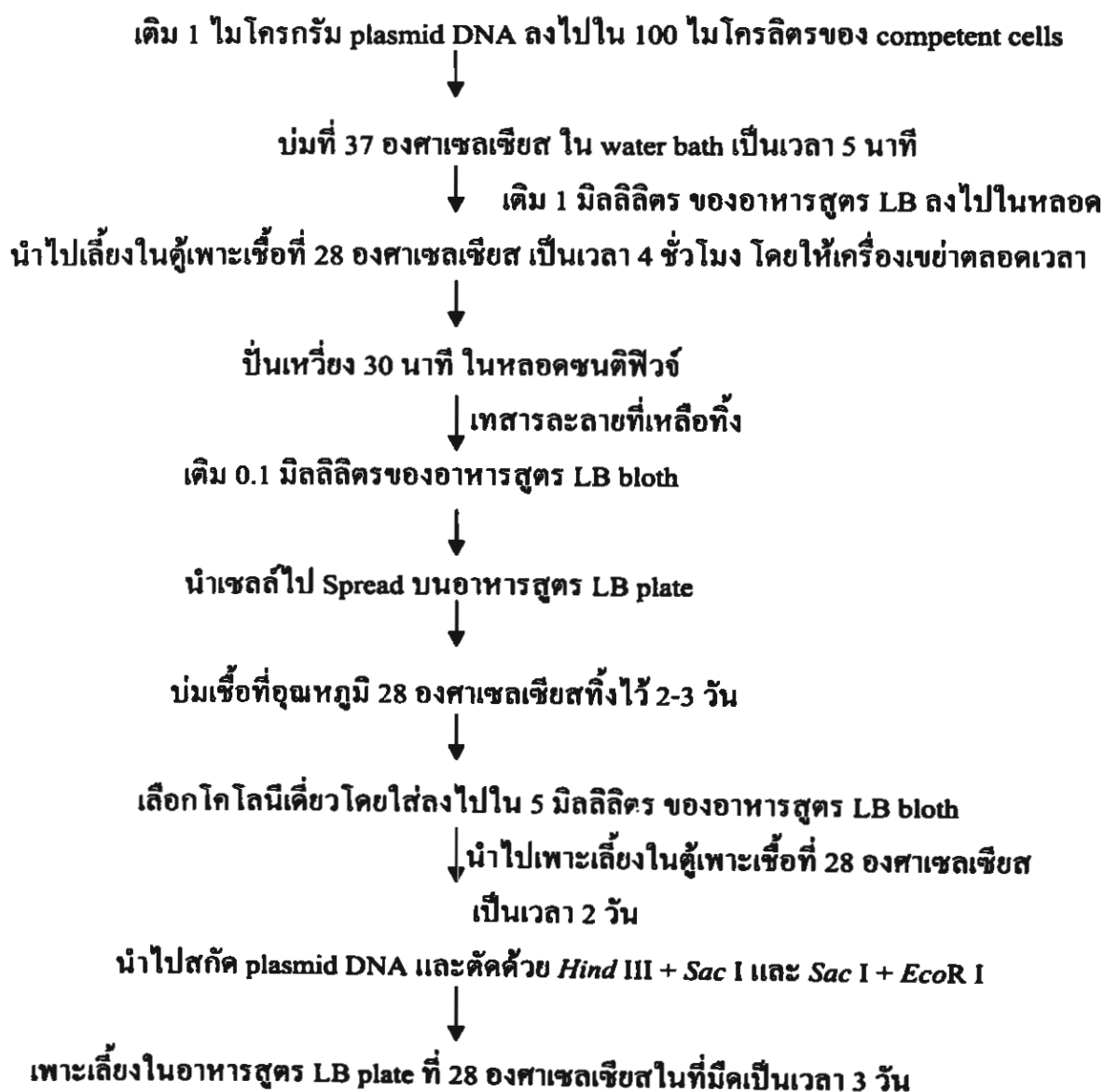
นำเมล็ดข้าวมา 100 เมล็ด ใส่ลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเข้าเป็นเวลา 2 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้งไปเติมน้ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ และเข้าเป็นเวลา 40 นาที แล้วเทโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ทิ้งไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 นาที ทำซ้ำ 4 ครั้ง เทสารละลายทิ้ง นำเมล็ดข้าวมาซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู นำเมล็ดข้าวมาวางบนอาหารสูตร NB medium ที่เติมน้ำ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรของ 2,4-D โดยใส่ 10 – 15 เมล็ดต่อ 1 เพตต 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

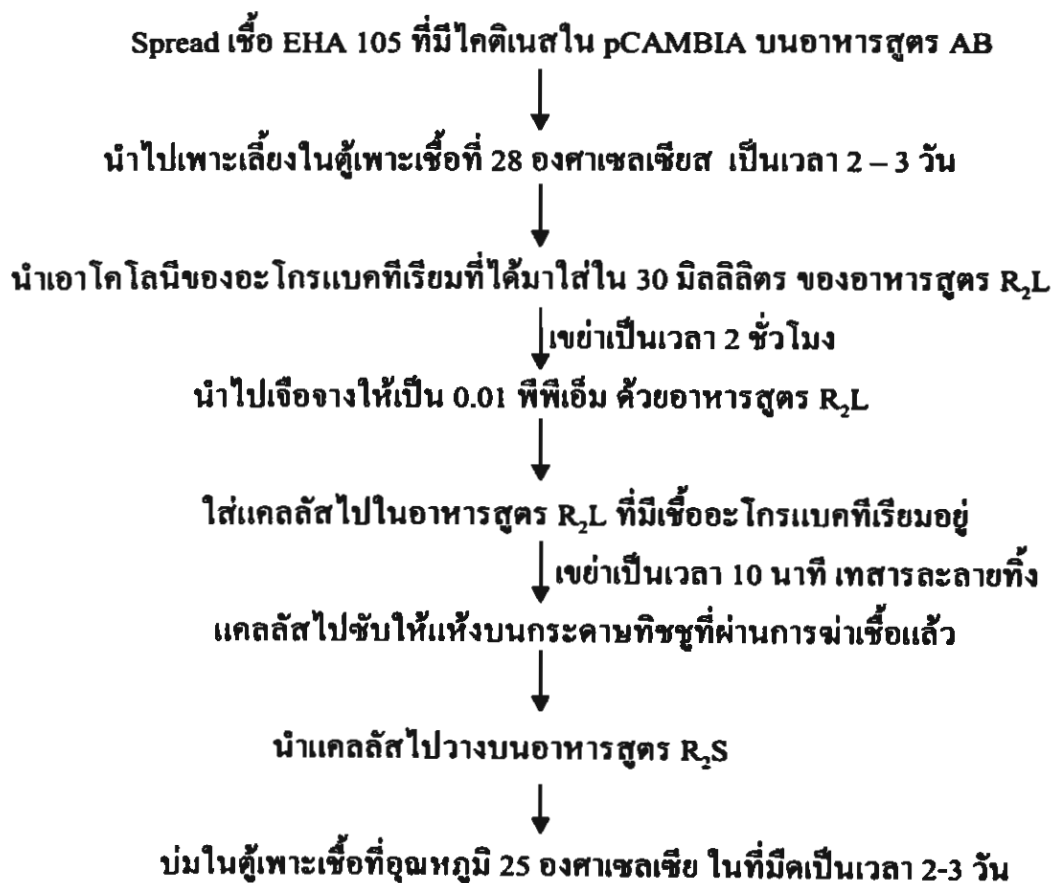
เติม 1 ไมโครกรัม ของพลาสมิดคีเอ็นเอ pCAMBIA 1300 + promoter + chitinase + NOS และ pCAMBIA 1301 ที่มี GUS gene มาใส่ใน 100 ไมโครลิตรของ competent cells จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร ของอาหาร LB broth แล้วนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 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 (เตรียมถ่ายฮีนโคติเนสเข้าไปในแคลกซ์ข้าว)



4. การถ่ายยีนโคติเนสเข้าแคลลัสข้าวด้วยอะโกรแบคทีเรีย

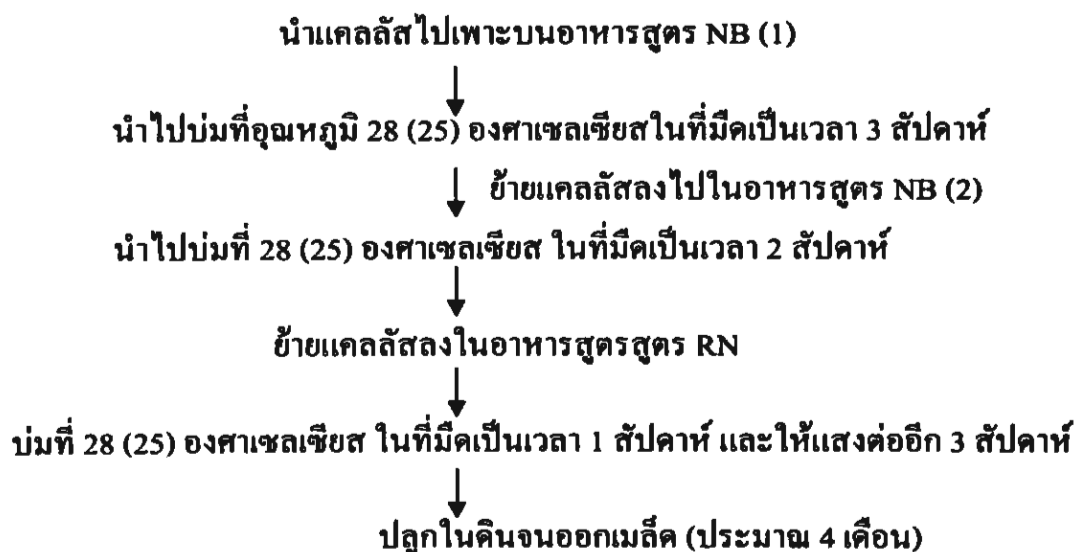
เชื้อเชื้อ EHA 105 + pCAMBIA บนอาหารสูตร AB + 50 มิลลิกรัมต่อลิตร Hm + 50 มิลลิกรัมต่อลิตร Km นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 วัน นำเอาโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียที่ได้มาใส่ใน 30 มิลลิลิตร ของอาหารสูตร R_2L + 50 ไมโครโมลาร์ของอะซิโดไซลิงโกน (ในหลอด 50 มิลลิลิตร) เขย่าเป็นเวลา 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

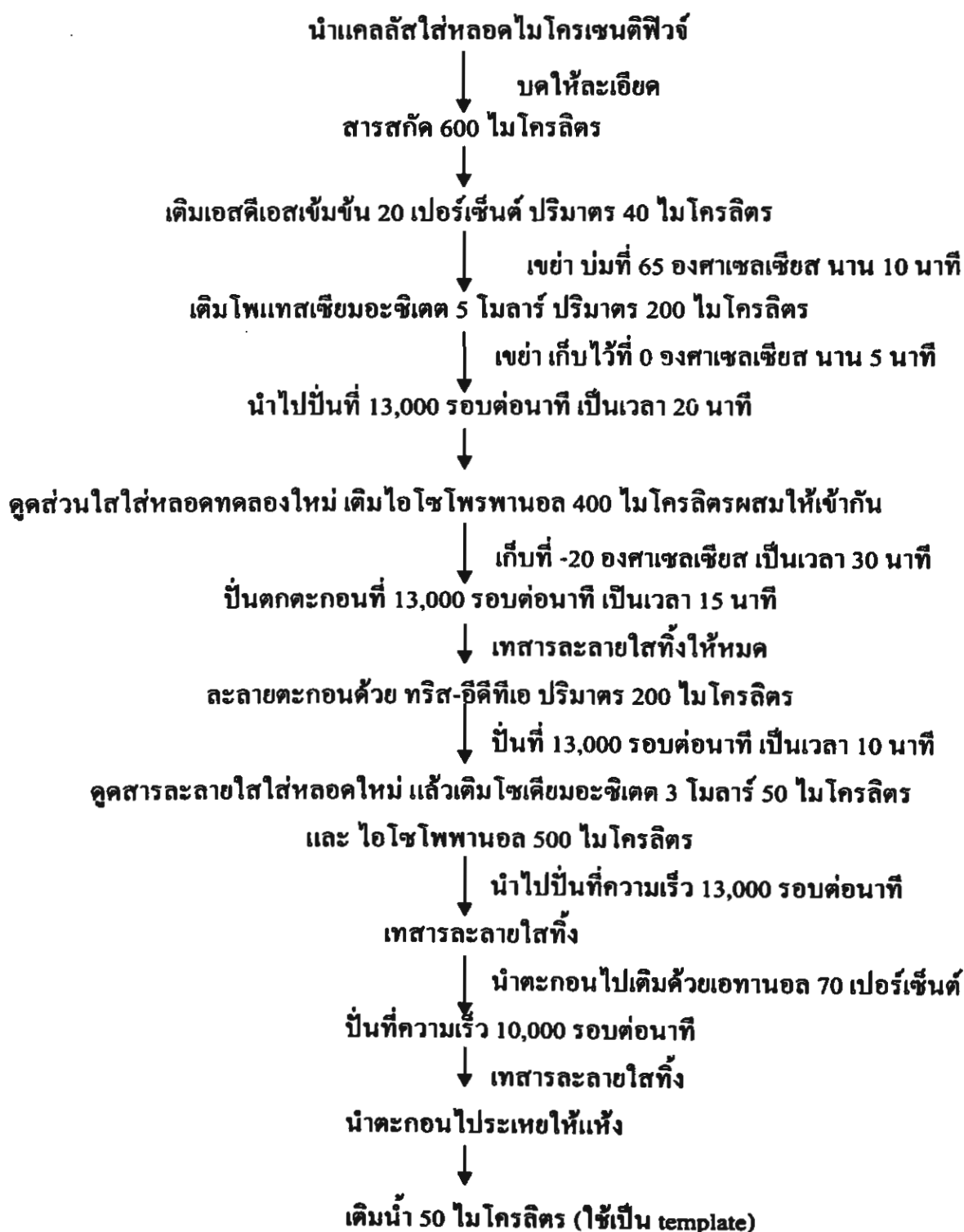
6.1 การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

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

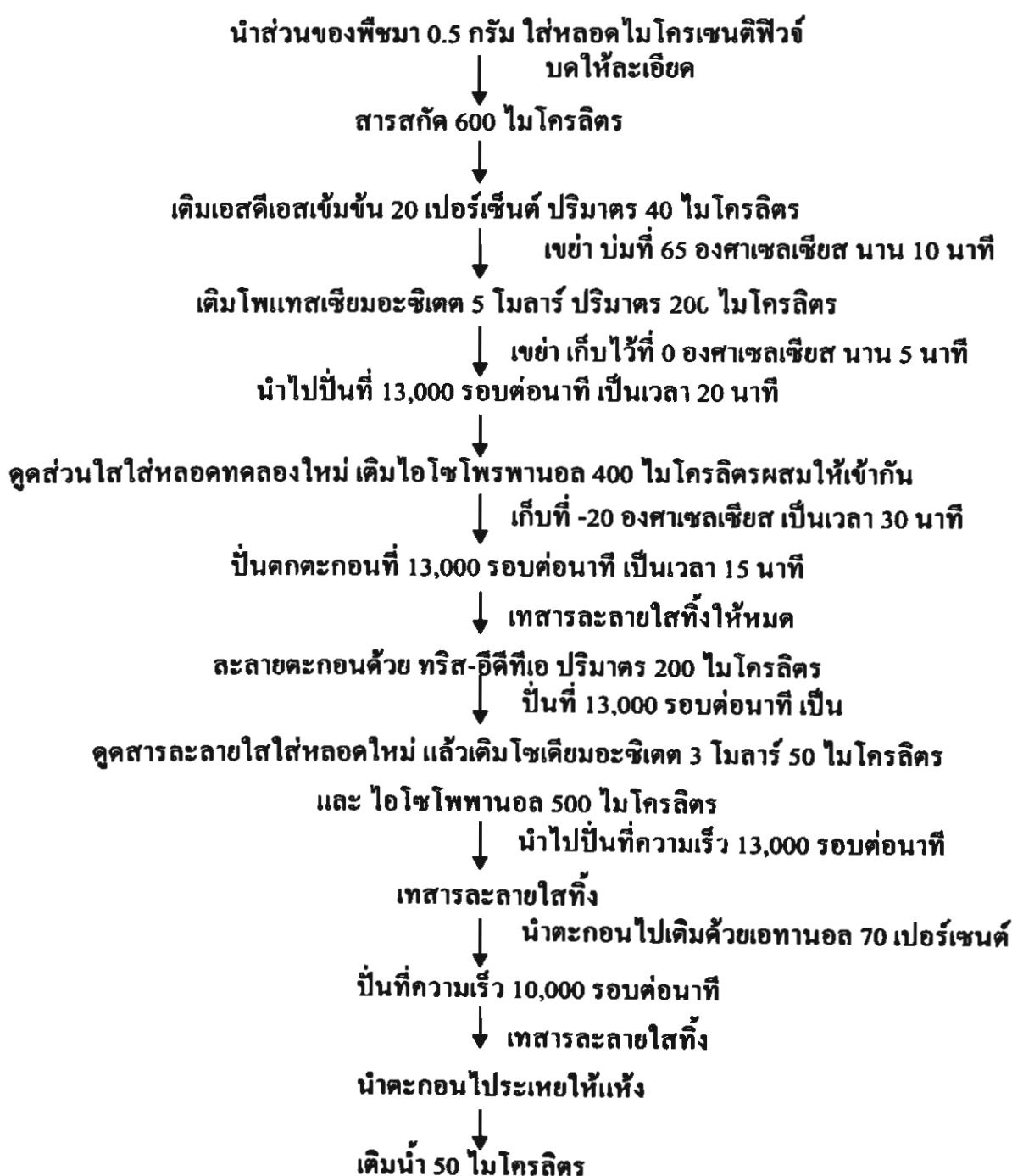


6.2 การทำ Southern blot

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

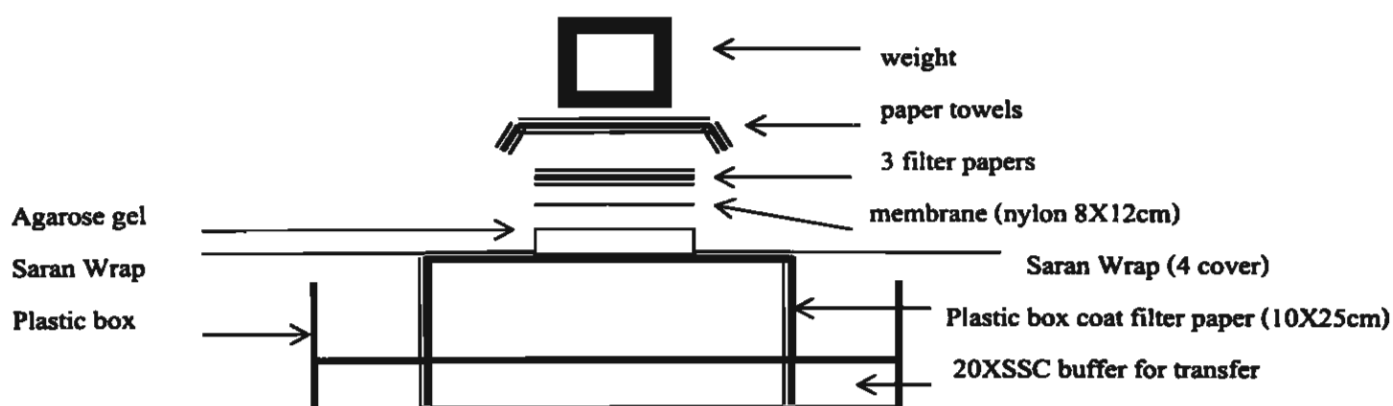
นำส่วนต่างๆ ของพืชมา 0.5 กรัม ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมน้ำสกัด 600 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด เติมนิวคลีเอสเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่า และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมนิวคลีเอสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อ นาที 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 ดูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่ 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

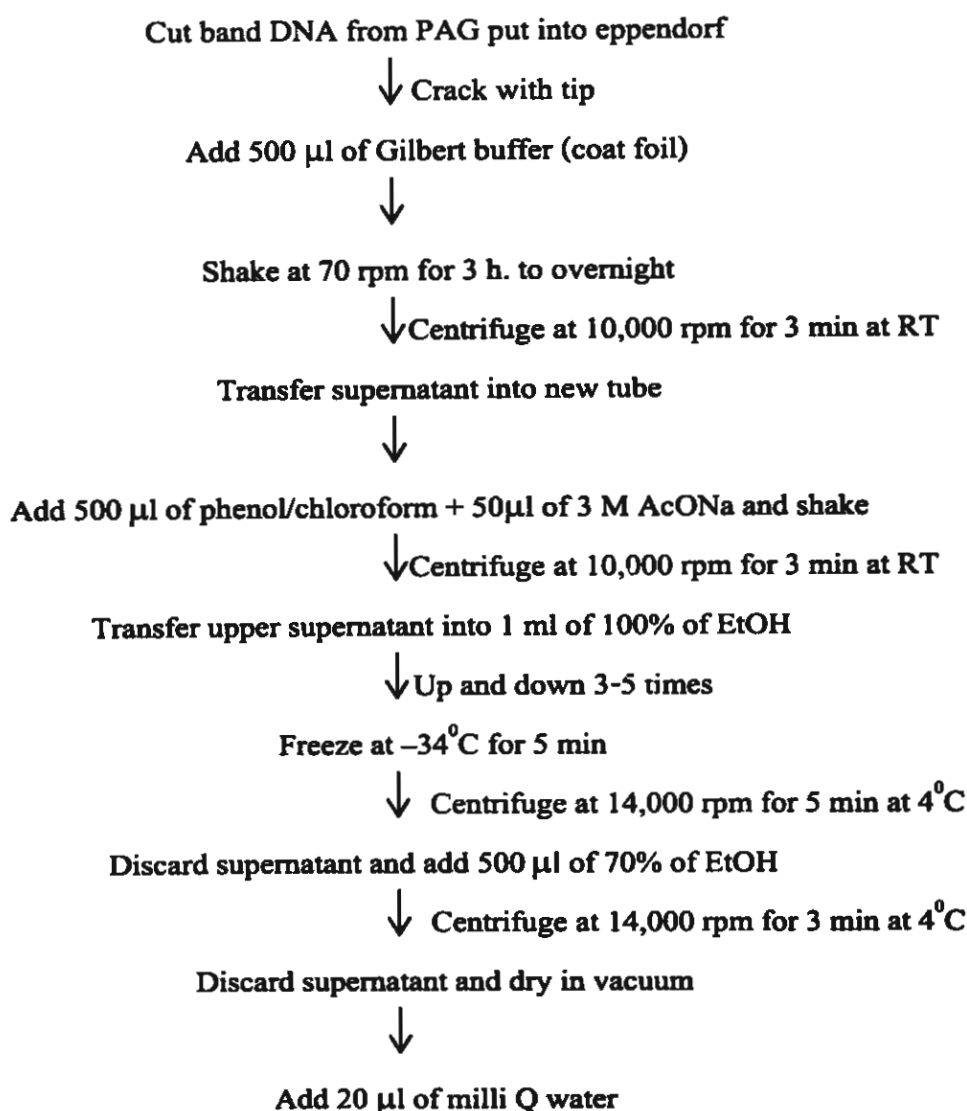


6.2.3 เตรียม Probe DNA ของ chitinase

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 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	

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

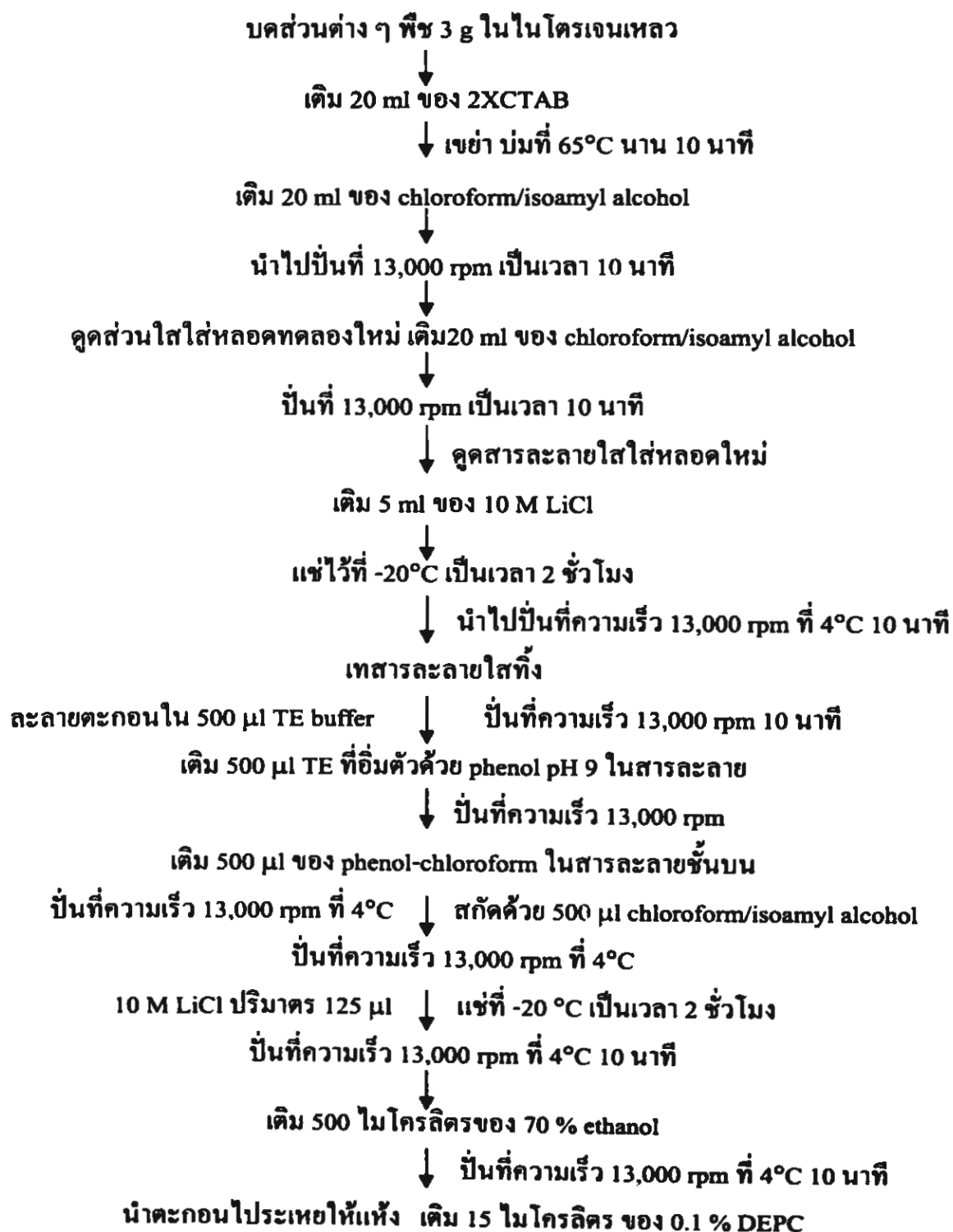
นำแผ่นฟิล์มมาล้างด้วยน้ำยา developer and replenisher เป็นเวลา 5 นาที 3% acetic เป็นเวลา 1 นาที น้ำยา fixer and replenisher เป็นเวลา 5 นาที และน้ำเป็นเวลา 15 นาที

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

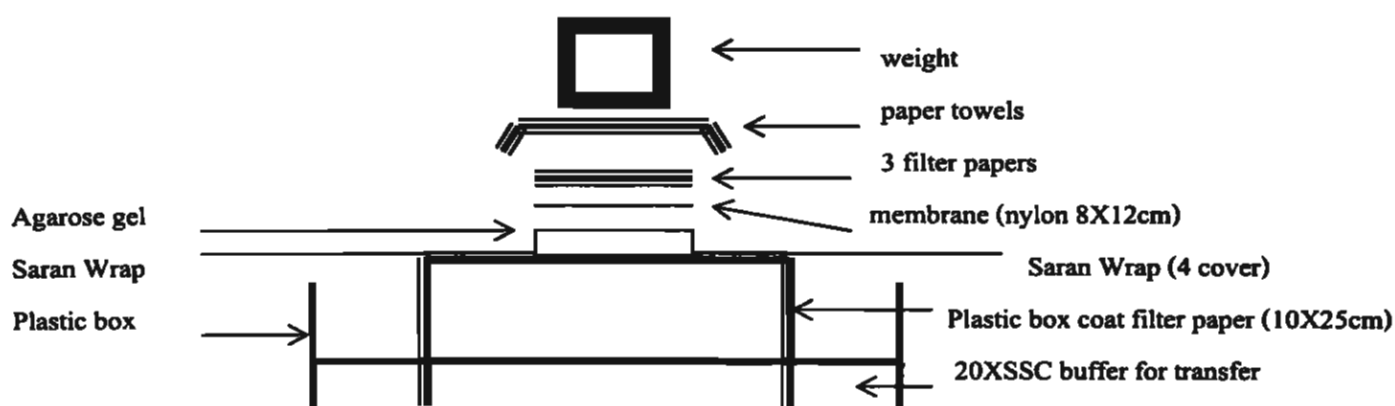
นำส่วนต่าง ๆ ของพืชมา 3 กรัม ใส่ในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียด ใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 20 มิลลิลิตร ของ 2XCTAB (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH9.5, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 5% β -mercaptoethanol) เขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วสกัดด้วย 20 มิลลิลิตร ของ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูณสารละลายใสข้างบนใส่หลอดใหม่ แล้วสกัดด้วย 20 มิลลิลิตร ของ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูณสารละลายใสข้างบนใส่หลอดใหม่ 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 ถ่ายสารละลายใส่หลอดใหม่ เติม 500 ไมโครลิตรของ TE ที่อิ่มตัวด้วย phenol pH 9 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายสารละลายใส่หลอดใหม่ 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 ล้างตะกอนด้วย 500 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol ทำให้แห้งและเติม 15 ไมโครลิตร ของ 0.1 % DEPC ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ



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 ดังเจลด้วยน้ำ 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

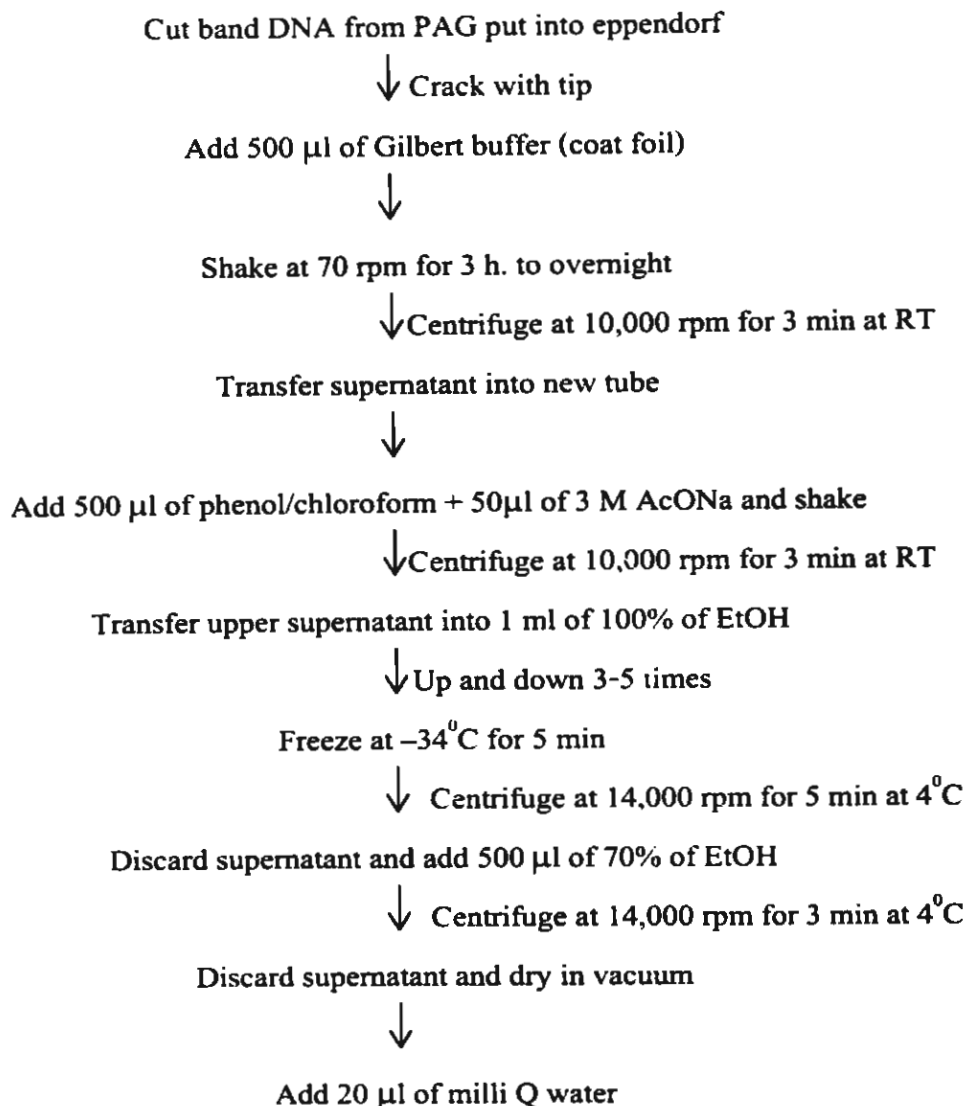


6.3.3 เตรียม Probe DNA ของ chitinase

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
AACGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCGATTATCAAAATCCAAGAGATGGATAACAAG
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
GCCTGCCCGGCCAATGGCTTCTACACCTACGATGCTTTCATTACGGCGGCCAATTCCTTACCTGCTTCGGGCAGCACCGGTGATGCCGCC
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
ACGCGCAAGAGGGAGGTGGCAGCTTTCCTCGGCCAAACTTCGCACGAGACCACAGGCGGTTGGCCAGCGCTCCCGACGGTCTTACGCC
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
ATCACTGGGAGATGGACCCCTCCGGCGCCGACACGGCAGCGGGTGGACTTCCAGGGTACGGAAACCACCACCAACATCATCAACGGAGGC
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
GCTCTGCCCTACTCTTATTCAATAAAATCAAGCGCCCGGAATTCANCTGGCCCTCGTTTACAANCNN
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
AACaGCTaTGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGATTATCAAATCCAAGAGATGGATAACAAG
      /      /      /      /
      HindIII  PstI  XbaI  BamHI

      100      110      120      130      140      150      160      170      180
AACAAAGATGCGGGTGCCTCTTGTGTGTGCTGCTGTACAGCCTCATGGTGGGAGGCTTAGCGGAGCAATGCCGGCAGGCAGGCAGGGGGTGC
      /
      PstI

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

      280      290      300      310      320      330      340      350      360
GGCAGCGGGCCAGCCCCCTCCCTCCGGTGGCCTCGCCAGCATCATCTCCAGGGACACCTTCAATCAGATGCTCAAGCACCGCAACGACGCC
      /
      PstI

      370      380      390      400      410      420      430      440      450
GCCTGCCCCGCCAATGGCTTCTACACCTACGATGCTTTTCATTTCAGGCGGCCAATCTTACCTGCTTCGGCAGCACCGGTGATGCCGCC
      /
      PstI

      460      470      480      490      500      510      520      530      540
ACGCGCAAGAGGGAGGTGGCAGCTTTCCTCGGCCAACTTCGCACGAGACCACAGGCGGTGGCCACGGCTCCCGACGGTCTTACGCC
      /
      PstI

      550      560      570      580      590      600      610      620      630
TGGGGTTACTGCTTCAAACAGGAACGGAACCCACCAAGCGCTTACTGTCAACCCAGCTCCCAATATCCATGTGCTCCCGGCAAGCAATAC
      /
      PstI

      640      650      660      670      680      690      700      710      720
TATGGCCCGGACCCCATGCAACTCTCCTGGAACCTACAACTACGGACAGTGCAGGAGAGCCATAGGAGCGGACTTGCTCAACAACCCCGAC
      /
      SacII

      730      740      750      760      770      780      790      800      810
CTGGTGGCCAGTGATGCTGTGATATCCTTCAAGACGGCTCTGTGGTTCTGGATGACAGCGCAGTCGCCCCAAGCCATCGTGCCACGACGTC
      /
      PstI

      820      830      840      850      860      870      880      890      900
ATCACTGGGAGATGGACCCCCCTCCGGCGCCGACACGGCAGCGGGTCGACTTCCAGGGTACGGAACCACCACCAACATCATCAACGGAGGG
      /
      PstI

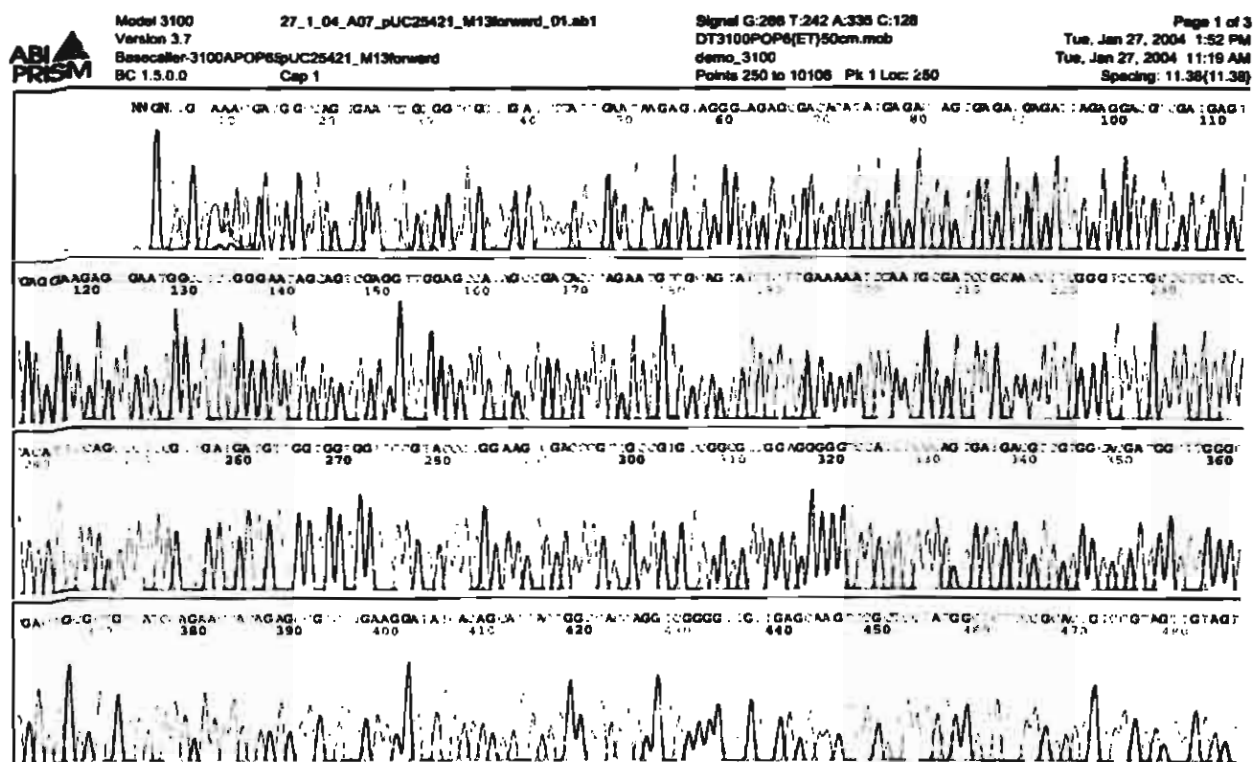
      910      920      930      940      950      960      970      980      990
CTGGAATGTGGGAGAGGGCAGGACCCGAGGGTTGCGGATCGCATTGGATTTTTCAAGAGATACTGCGACATTCTGGGTGTGGCTATGGC
      /
      PstI

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

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

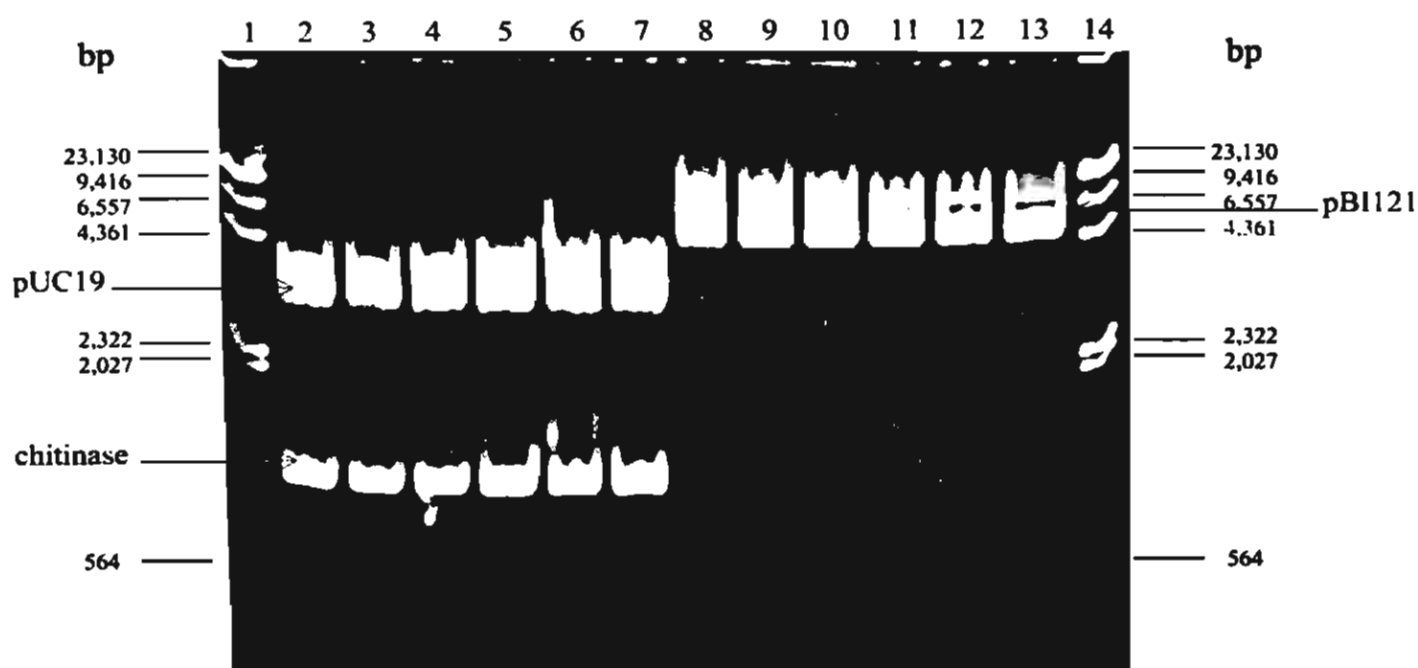
```

ภาพที่ 4.2 จุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในลำดับเบสของโคตินีน



ภาพที่ 4.6 โครมาโตแกรมเบสของโคคิเนสในพลาสมิด pUC19 โดยใช้ primer reverse โคลนที่ 2

2 พลาสมิด pUC19 ที่มียีนไคตินเนสจากกระดิ่งบ้านขนาดประมาณ 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



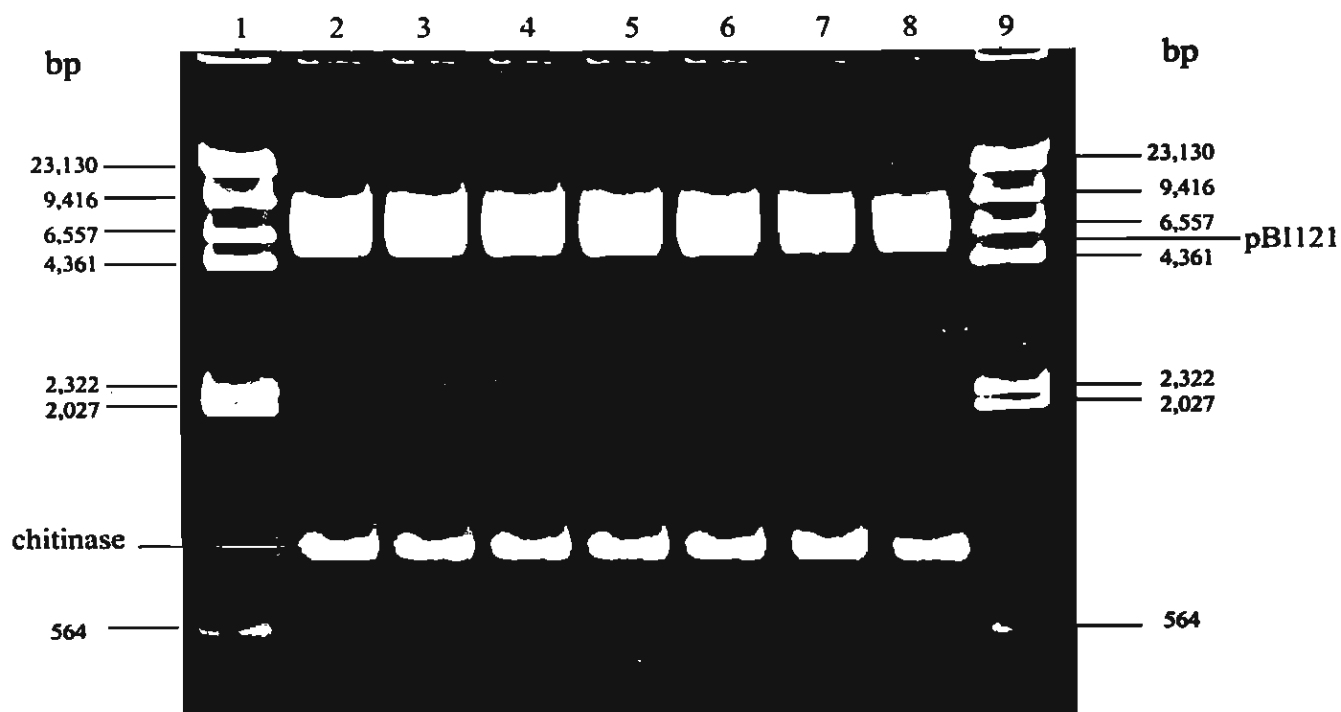
ภาพที่ 4.7 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pUC19 และไคตินเนสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I และแบนด์ของพลาสมิด pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I

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

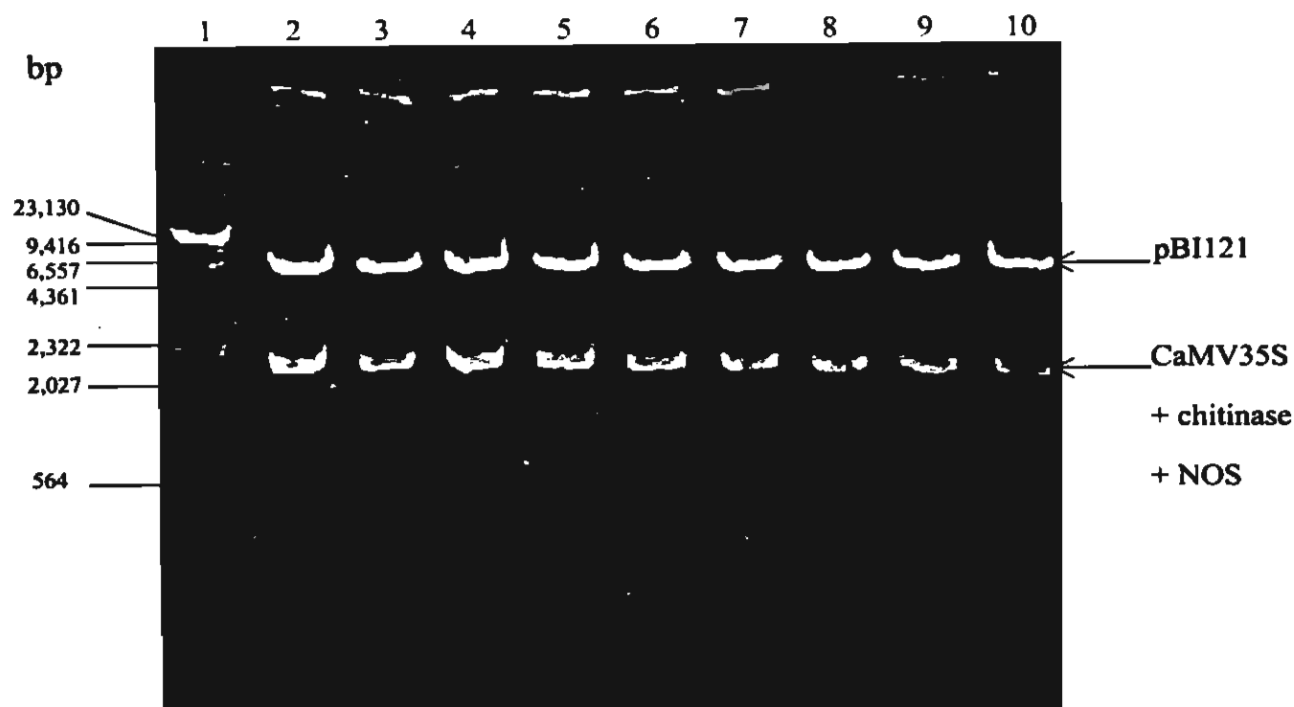


ภาพที่ 4.8 ขนาดแบนด์ของพลาสมิด pBI121 และไคตินเนสที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I

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

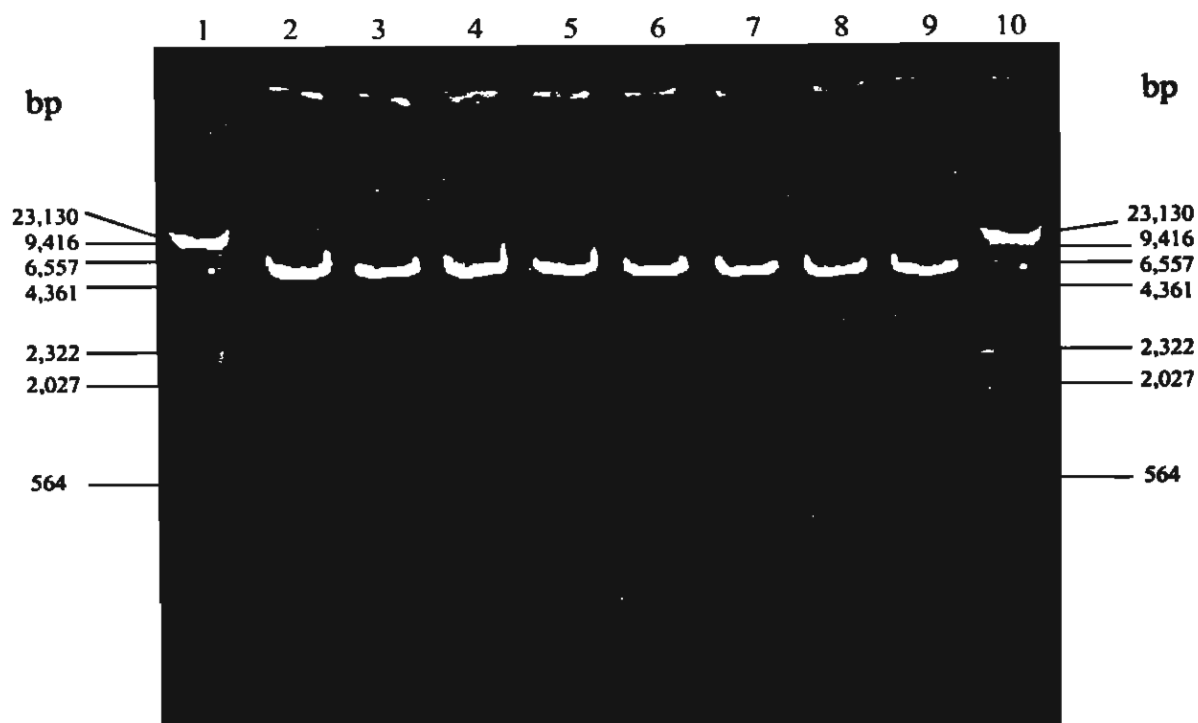


ภาพที่ 4.9 ขนาดแบนด์ของแบนด์ของพลาสมิด pBI121 และ promoter CaMV35S + chitinase + NOS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI + *Sac* I

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

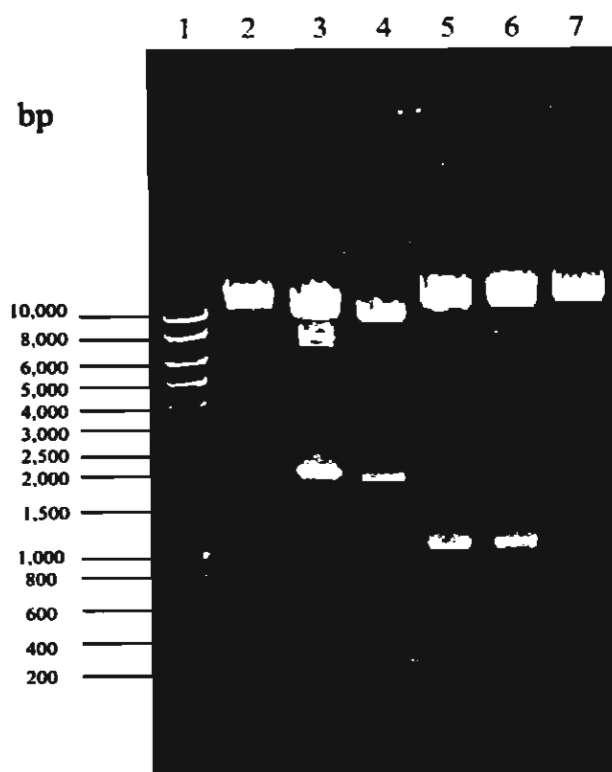


ภาพที่ 4.10 แบนด์ขนาด 8,958 bp ของพลาสมิด pCambia 1300

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 และข้าวโกชิอิการิให้เจริญเป็นแคลลัส (control)

จากการศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวคอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB medium ที่เติม 2,4-D โดยเฉพาะเลี้ยงไว้ในที่มีดเป็นเวลา 5 สัปดาห์ เกิดแคลลัสของข้าวคอกมะลิ 105 เท่ากับ 97.5 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่งอกรากเท่ากับ 86.75 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดขึ้นเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของข้าวโกชิอิการิเกิดแคลลัส 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 อัตราการเกิดแคลลัสที่ได้จากการชักนำเมล็ดข้าวโกชิอิการิ

ครั้งที่	จำนวนเมล็ดข้าวโกชิอิการิ	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



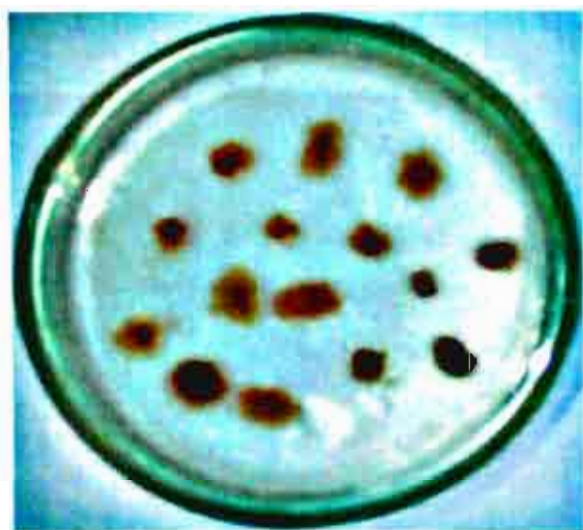
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.12 แคลกต์ข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 2 สัปดาห์

(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกจิฮิการิ



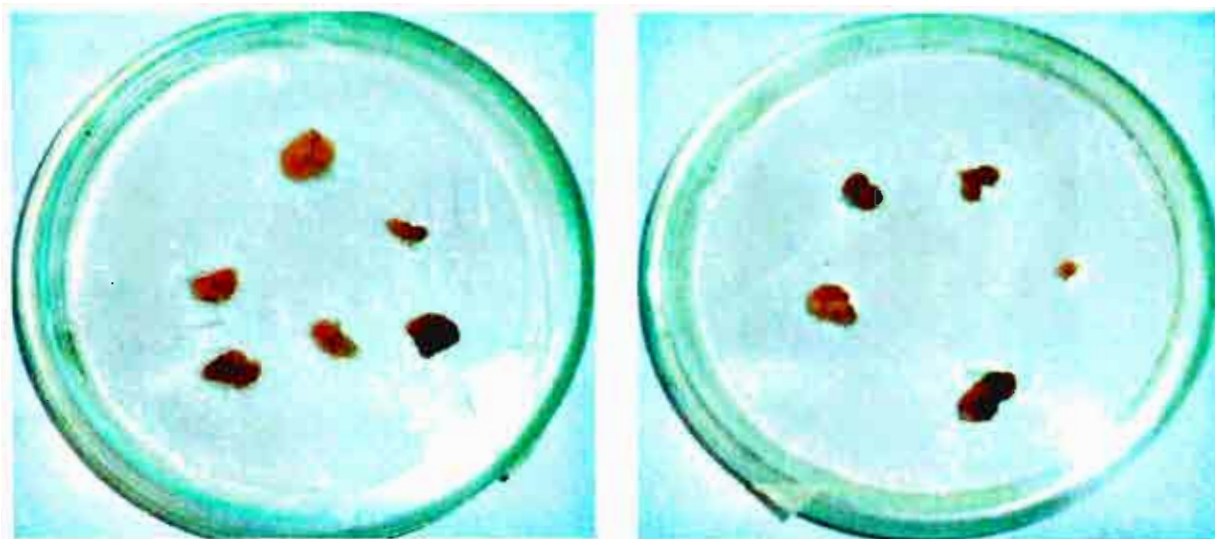
(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.13 แคลกต์ข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 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