

การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวไทยพันธุ์ กข 6
โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

**Multiple Shoot Induction and Shoot Apex Transformation of
Thai Glutinous Rice cv. RD 6 Using *Agrobacterium tumefaciens***

ณิชนัน ธรรมรักษ์¹ แสงทอง พงษ์เจริญกิต² วราภรณ์ แสงทอง²
นลินี รุ่งเรืองศรี² เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี³ และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์²

¹หน่วยวิจัยและบริการจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ สำนักงานอธิการบดี
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

³ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

E-mail: nitchamon_palm@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณและการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยทำการศึกษาระดับฮอร์โมน Thidiazuron (TDZ) ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณ (multiple shoots) จากยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เพื่อใช้สำหรับการพัฒนาระบบการถ่ายยีนในยอดอ่อน พบว่า อาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งมีฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ดีที่สุด ร้อยละ 32.5 โดยมีจำนวนยอด 7.72 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 พบว่า มียอดอ่อนเจริญได้บนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มีฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. และสารปฏิชีวนะไฮโกลมัยซิน 30 มก./ล. ร้อยละ 77.78 และสามารถเจริญเป็นต้นและเกิดรากได้ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค GUS assay พบว่า มียอดอ่อนเกิดจุดสีฟ้า ร้อยละ 10.64 (5 ต้น) แสดงว่า สามารถถ่ายยีนในยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ แต่ยังมีประสิทธิภาพต่ำ ซึ่งจะต้องพัฒนาระบบการถ่ายยีนต่อไป

คำสำคัญ: การถ่ายยีนในยอดอ่อน เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ฮอร์โมน Thidiazuron (TDZ)

Abstract

Shoot apex transformation of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD 6 was studied. Multiple shoot induction from rice shoot apical meristems using various concentration of Thidiazuron (TDZ) for shoot apex transformation system development was investigated. The results showed that MS medium supplemented with 8 mg/L TDZ induced highest multiple shoots (32.5%) and produced the maximum number of shoots (7.72 shoots per explant). Then, we performed shoot apex transformation using *Agrobacterium tumefaciens* harbouring pCAMBIA 1305.2. The 77.78 percentage of RD 6 transformed shoots were obtained after culture on selection medium and

produced plantlets. GUS activity was detected on leaf segments of 10.64 percents T_0 transgenic plants (5 plants). All shoot apex transformation results indicated that we successfully transformed *indica* rice cv. RD 6. However, the transformation efficiency was still low and needs more improvement.

Key words: shoot apex transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, RD 6 rice, Thidiazuron (TDZ)

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของประชากรโลก ซึ่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรว่า มีคุณสมบัติทนแล้ง มีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม และต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล โรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และแมลงบั่ว โดยได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการเพาะปลูกในทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งมีพื้นที่โดยรวมจำนวน 14,862,082 ไร่ และมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ประมาณ 348 กิโลกรัมต่อไร่ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวต่างประเทศ, 2551) ปัจจุบันเทคนิคพันธุวิศวกรรมได้รับความสนใจ และนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมากขึ้น โดยเป็นการถ่ายยีนซึ่งควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าไปในข้าว ซึ่งสามารถคงลักษณะที่ดีของพันธุ์เดิมไว้ และใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์สั้นกว่าวิธีอื่น

Thidiazuron (TDZ) เป็นฮอร์โมนในกลุ่มของไซโตไคนินซึ่งมีรายงานการวิจัยว่ามีผลต่อการยอดทวีกุณของพืชหลายชนิด และจากการศึกษาของ Yookongkaew และคณะ (2007) พบว่า ฮอร์โมน TDZ มีผลต่อการเกิดยอดทวีกุณของข้าวไทยหลายสายพันธุ์ โดยที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 4 มก./ล. สามารถชักนำให้ข้าวไทย หลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง กข 10 ชัยนาท 1 เหนียวสันป่าตอง ปิ่นแก้ว 56 เป็นต้น เกิดยอดทวีกุณได้จำนวนมาก และนำไปประยุกต์ใช้ในการถ่ายยีน pCambia 1301 เข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่สมบูรณ์ได้ ในขณะที่ณิชนม (2551) พบว่า สามารถถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่เซลล์ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ แต่เซลล์ที่ได้รับยีน ไม่สามารถเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ ดังนั้นการถ่ายยีนในยอดอ่อนของข้าวไทยอาจจะเป็นวิธีหนึ่งที่มีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จได้มากกว่าการถ่ายยีนในเซลล์

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองหาระดับฮอร์โมน TDZ ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีกุณจากยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้เกิดยอดทวีกุณ (multiple shoots) ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

นำเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เข้มข้น ร้อยละ 10 นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงให้เกิดต้น บนอาหารสูตร MS ในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 วัน จากนั้นแยกเอาเฉพาะส่วนของยอดอ่อน ขนาดประมาณ 0.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งมีการเติมฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 0, 2, 4 และ 8 มก./ล. ในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตการเกิดยอดทวีกุณ โดยบันทึกผลจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอดทวีกุณ และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน

การถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

ทำการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA 1305.2 ด้วยวิธีการดัดแปลงจาก Toki (1997) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร AB ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 25 และ 50 มก./ล. ตามลำดับ ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียลงในอาหารเหลวสูตร AAM ซึ่งมี acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เขี่ยยอดอ่อนลงในสารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรีย นาน 15 นาที จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้ออะโกรแบคทีเรียและยอดอ่อนบนอาหารแข็งสูตร 2N6-AS นาน 3 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ทำการล้างเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกด้วยน้ำกลั่น และอาหารเหลวสูตร MS ซึ่งมีสารละลายไทเมนติน เข้มข้น 150 มก./ล. แล้วคัดเลือกยอดอ่อนที่ได้รับยีนบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน TDZ ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอดทวีกุณซึ่งมีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและไทเมนติน เข้มข้น 30 และ 150 มก./ล. ตามลำดับ นาน 2 สัปดาห์ แล้วย้ายชิ้นส่วนที่เจริญได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม นาน 10 วัน หลังจากนั้นจึงชักนำให้เกิดรากด้วยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน ซึ่งมีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและไทเมนติน เข้มข้น 30 และ 75 มก./ล. ตามลำดับ

การตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับยีน

ใช้เทคนิค GUS assay (Jefferson *et al.*, 1987) โดยการตัดใบข้าวมาบ่มในสารละลาย X-gluc ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกิดสารสีฟ้า

ผลการทดลองและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดยอดทวีกุณของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

การทดลองชักนำให้เกิดยอดทวีกุณของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้นำเมล็ดแก่มาลอกเปลือกออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นเพาะเลี้ยงให้เกิดต้นอ่อนโดยใช้อาหารสูตร MS เป็นเวลานาน 3 วัน แล้วแยกเอาส่วนของยอดอ่อนขนาดยาวประมาณ 0.5 ซม. มาชักนำให้เกิดยอดทวีกุณ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งมีการเติมฮอร์โมน TDZ ที่ระดับ 0, 2, 4 และ 8 มก./ล. เป็นเวลานาน 17 วัน พบว่า ระดับฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. ชักนำให้ยอดอ่อนเกิดยอดทวีกุณมากที่สุด เท่ากับ 7.72 ยอดต่อชิ้นส่วน มีการเกิดยอดทวีกุณ ร้อยละ 32.5 ในขณะที่ระดับฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 4 มก./ล. ทำให้เกิดยอดทวีกุณ 6.50 ยอดต่อชิ้นส่วน โดยมีการเกิดยอดทวีกุณ ร้อยละ 40 (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1)

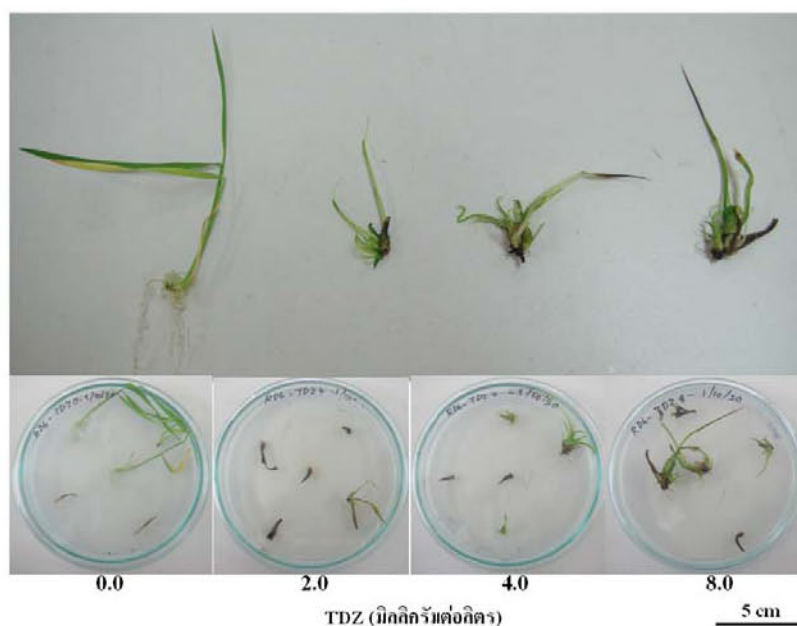
การชักนำให้เกิดยอดทวีกุณควรใช้อาหารสูตร MS ซึ่งมีฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. ซึ่งจะได้ยอดทวีกุณจำนวนมากกว่าการใช้ฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 4 มก./ล. โดยต้นข้าวที่ได้มีจำนวนมากว่า และขนาดใหญ่กว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 1) ขณะที่ Yookongkaew *et al.* (2007) พบว่า การใช้ TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. ทำให้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดยอดทวีกุณได้ 7 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ยอดมีขนาดเล็กและไม่แข็งแรง ส่วนการใช้ TDZ เข้มข้น 4 มก./ล. เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดยอดทวีกุณในข้าวพันธุ์ขาว

ดอกมะลิ 105 และข้าวไทยหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง กข 10 ตะเภาแก้ว R258 และ Chiang Pattalung โดยชักนำให้เกิดยอดทวีกุณประมาณ 4-7 ยอดต่อชิ้นส่วน เนื่องจาก TDZ เป็นฮอร์โมนในกลุ่มของไซโตไคนินซึ่งมีรายงานว่ามีการใช้เพื่อเพิ่มจำนวนต้นในพืชหลายชนิด (Gairi and Rashid 2004; Goldman *et al.* 2003; Srivatanakul *et al.* 2000).

ตารางที่ 1 ร้อยละของการเกิดยอดทวีกุณของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้ฮอร์โมน TDZ ที่ระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของ TDZ (มก./ล.)	จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อ ชิ้นส่วน*	ร้อยละของการเกิด ยอดทวีกุณ*
0	21	1.00 ^c	0.0 ^c
2	21	5.00 ^b	23.3 ^b
4	21	6.50 ^{ab}	40.0 ^a
8	21	7.72 ^a	32.5 ^{ab}

* ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 1 การเกิดยอดทวีกุณของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้ฮอร์โมน TDZ ที่ระดับต่างๆ

การถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

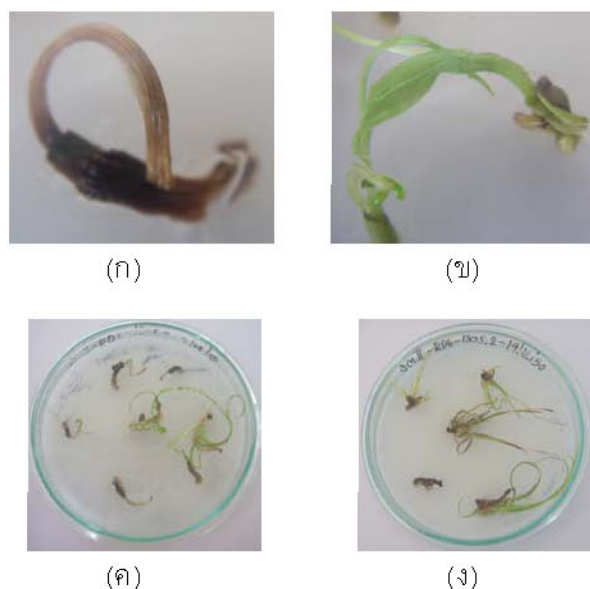
จากการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 โดยมีระยะเวลาในการปลูกเชื้อ (infection) 15 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 2N6-AS เป็นเวลานาน 3 วัน จากนั้นจึงทำการคัดเลือกยอดอ่อนที่ได้รับยีน โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มีฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และไทเมทิน เข้มข้น 30 และ 150 มก./ล. ตามลำดับ ในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า หลังการถ่ายยีนจะพบยอดอ่อนซึ่งสามารถเจริญได้มีสีเขียวคาดว่าได้รับยีนที่ถ่ายเข้าไป ในขณะที่ยอดอ่อนบางส่วนมีสีน้ำตาลซึ่งคาดว่าไม่ได้รับยีน (ภาพที่ 2)

หลังการถ่ายยีน เมื่อทำการคัดเลือกยอดอ่อนที่ได้รับยีน ครั้งที่ 1 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก นาน 14 วัน พบว่า มียอดอ่อนที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก ร้อยละ 42.86 เมื่อทำการคัดเลือกยอดอ่อนที่ได้รับยีน ครั้งที่ 2 โดยย้ายชิ้นที่ส่วนที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตรเดิม นาน 10 วัน พบว่า มียอดอ่อนที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก ร้อยละ 77.78 (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในยอดอ่อนข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย
หลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก

การคัดเลือก	จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญได้	ร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญได้	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน
ครั้งที่ 1	21	9	42.86	9.53
ครั้งที่ 2	9	7	77.78	10.57

เมื่อย้ายยอดอ่อนที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินไปกระตุ้นให้เกิดราก โดยแยกยอดทวิคูณออกเป็นยอดเดี่ยวแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และไทเมทิน เข้มข้น 30 และ 75 มก./ล. ตามลำดับ เป็นเวลานาน 14 วัน พบว่า มียอดอ่อนที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เท่ากับร้อยละ 64.86 (ตารางที่ 3) แต่ต้นอ่อนที่ได้ยังไม่เกิดรากและยังมีลักษณะเป็นยอดทวิคูณ (ภาพที่ 3) อาจเนื่องมาจากระดับฮอร์โมน TDZ ซึ่งใช้กระตุ้นให้เกิดยอดแบบทวิคูณอยู่ในระดับสูง ซึ่งอาจยังคงมีฤทธิ์ตกค้างอยู่ภายในเซลล์ จึงย้ายยอดอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกระตุ้นให้เกิดรากอีกครั้ง (ครั้งที่ 2) โดยใช้อาหารสูตรเดิม พบว่า ยอดอ่อนที่ถ่ายยีนสามารถเจริญและเกิดราก ร้อยละ 97.92 (ตารางที่ 3) แล้วจึงทำการแยกปลูกและตรวจสอบการได้รับยีนด้วยเทคนิค GUS assay พบว่า ใบข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ไม่เกิดสารสีฟ้า ในขณะที่ใบข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 เกิดสารสีฟ้าบริเวณรอยตัด และกลางใบ จำนวน 5 ต้น จาก 47 ต้น คิดเป็นร้อยละ 10.64 (ภาพที่ 4) แสดงว่า ระบบที่ดัดแปลงขึ้นสามารถถ่ายยีนในยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ แต่ยังคงมีประสิทธิภาพที่ต่ำ Yookongkaew *et al.* (2007) พบว่า สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ดังนั้นจะต้องทำการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนในยอดอ่อนต่อไป อย่างไรก็ตามวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนทำได้รวดเร็วกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัส (Cho *et al.* 2003)



ภาพที่ 2 ลักษณะของยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกหลังการถ่ายยีน

- (ก) ยอดอ่อนที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก
 (ข) ยอดอ่อนที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก
 (ค) ยอดอ่อนที่ถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1
 (ง) ยอดอ่อนที่ถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในยอดอ่อนข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย หลังการกระตุ้นให้เกิดราก

การกระตุ้นให้ เกิดราก	จำนวน ชิ้นส่วน ทั้งหมด	จำนวน ชิ้นส่วนที่ สามารถ เจริญได้	ร้อยละของ ชิ้นส่วนที่ สามารถ เจริญได้	จำนวนชิ้นส่วน ที่เกิดราก	ร้อยละของ ชิ้นส่วนที่เกิด ราก
ครั้งที่ 1	74	48	64.86	0	0.0
ครั้งที่ 2	48	47	97.92	47	97.92



ภาพที่ 3 ลักษณะของยอดอ่อนที่ถ่ายยีนซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารกระตุ้นให้ออกราก



ภาพที่ 4 ลักษณะการเกิดจุดสีฟ้าของต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อน

หมายเหตุ: C คือ ใบข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ไม่ได้ถ่ายยีน

1305.2 #1, 9, 32, 43 และ 44 คือ ใบข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2
ต้นที่ 1, 9, 32, และ 44

สรุปผลการทดลอง

อาหารสูตร MS ซึ่งมีฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 8 มก./ล. เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งจะได้ยอดทวิคูณจำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว และจากการทดลองประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยพบว่า ต้นข้าวมีการแสดงออกของยีนรายงานผล (*gusPlus*) และมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีน ร้อยละ 10.64 ซึ่งในอนาคตจะต้องทำการตรวจสอบการแทรกตัวของยีนในจีโนม และศึกษาปัจจัยอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย
ขอขอบพระคุณ Professor Dr.Thomas W. Okita (Washington State University, USA) ที่ให้ความ
อนุเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และขอขอบพระคุณ ดร.เมธิณี ศรีวัฒนกุล (สำนักวิจัยพัฒนา
เทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร) ที่ให้คำปรึกษาสำหรับการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ณิชนน ธรรมรักษ์. 2551. การศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าวญี่ปุ่น
พันธุ์ Kitaake และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้: เชียงใหม่. 153 น.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวต่างประเทศ. 2551. ผลผลิตข้าว. จาก <http://www.rice exporters.or.th/production.htm>
[12 พฤษภาคม 2551].
- Cho, M.J., H.W. Choi, D. Okamoto, S. Zhang, P.G. Lemaux. 2003. Expression of green
fluorescent protein and its inheritance in transgenic oat plants generated from shoot
meristematic cultures. **Plant Cell Rep.** 21: 467-474.
- Gairi, A. and A. Rashid. 2004. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses
of rice using a short treatment with 2,4-D. **Plant Cell Tiss Org Cult.** 76: 29-33.
- Goldman, J.J., W.W. Hanna, G. Fleming and P. Ozias-Akins. 2003. Fertile transgenic pearl millet
[*Pennisetum glaucum* (L.) R.r.] plants recovered through microprojectile bombardment and
phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence, and immature embryoderived
embryogenic tissues. **Plant Cell Rep.** 21: 999-1009.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Mol
Biol Rep.** 5: 387-405.
- Srivatanakul M., S. Park, J. Sanders, M. Salas and R. Smith. 2000. Multiple shoot regeneration of
kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. **Plant Cell Rep.** 19:1165-
1170
- Toki, S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. **Plant Molecular
Biology Reporter.** 15: 16-21.
- Yookongkaew N., M. Srivatanakul and J. Narangajavana. 2007. Development of genotype-
independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. indica).
J Plant Res. 120 (2): 237-245.