ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ผู้เขียน นางสาวบุปผา วุฒิเฟย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ดร. รัฐพร จันทร์เดช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ ศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ที่มียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกและยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดและแคลลัสของข้าวบือโปะโละ โดยในขั้นตอนแรกได้ทดสอบการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพิทูเนียซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ พบว่าประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน จากนั้นทำการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เข้าสู่แคลลัสของข้าวคิตาอิเกะ (ข้าวกลุ่มจาโปนิกา) และเนื้อเยื่อปลายยอดและแคลลัสของข้าวบือโปะโละ (ข้าวกลุ่มอินดิกา) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พบว่า สามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวคิตาอิเกะได้ สำหรับข้าวบือโปะโละพบว่าการใช้กานามัยซินความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อปลายยอดและแคลลัสที่ได้รับยีนตามลำดับ และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เป็นแคลลัส และสูตรอาหาร RE1 (MS+ 300 mg/L casamino acid + 100 mg/L yeast extract + 500 mg/L L- proline + 500 mg/L L- glutamine +30 g/L sucrose + 4 mg/L BA + 6 g/L phytagel) สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical และเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดและแคลลัสของข้าวบือโปะโละเกิดสีฟ้าและเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 500 คู่เบส แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละเท่ากับ 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แคลลัสข้าวบือโปะโละ พบว่าการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 เท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 เท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์ และ 34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Plasmid Transformation into Rice (*Oryza sativa* L. cv. Ber Po Lo) Using *Agrobacterium* spp.

Author Miss Buppha Wuttifery

Degree Master of Science (Biology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Advisor
Dr. Rataporn Chandej Co-advisor

ABSTACT

The aim of this study was to transform pSTART and pBI121 containing *nptII* (kanamycin resistance) and *gus* (reporter gene) into shoot apex and callus of *Oryza sativa* L. cv. Ber Po Lo by *Agrobacterium tumefaciencs* strain LBA4404 and EHA105. Both plasmids were transformed to *Nicotiana tabacum* L. and *Petunia hybrida* Vilm. as positive control for dicotyledonous plants and *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. kitaake as positive control for monocotyledonous plants. As results, transforming these plasmids into shoot apex and callus of *Oryza sativa* L. cv. Ber Po Lo was successful. The results showed that 100 mg/L and 150 mg/L kanamycin were effective for transformant selection of shoot apex and callus respectively. The optimal medium for callus induction was MS medium supplemented with 4 mg/L 2,4 D and the regeneration medium was MS+ 300 mg/L casamino acid + 100 mg/L yeast extract + 500 mg/L L- proline + 500 mg/L L-glutamine + 30 g/L sucrose + 4 mg/L BA + 6 g/L phytagel. Histochemical GUS assay showed blue color in shoot apex and callus and PCR analysis detected 500 bp fragment of the *gus* gene.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Transformation efficiency of shoot apex transformed by LBA4404 (pSTART) and LBA4404 (pBI121) was 0.5% and 0.1% respectively. However, the 500 bp fragment of *gus* gene was not found in shoot apex transformed by EHA105 (pSTART) and EHA105(pBI121). Transformation efficiency of callus transformed by LBA4404 (pSTART), LBA4404 (pBI121), EHA105 (pSTART) and EHA105 (pBI121) were 42% , 32% , 49% and 34 % respectively .

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved