

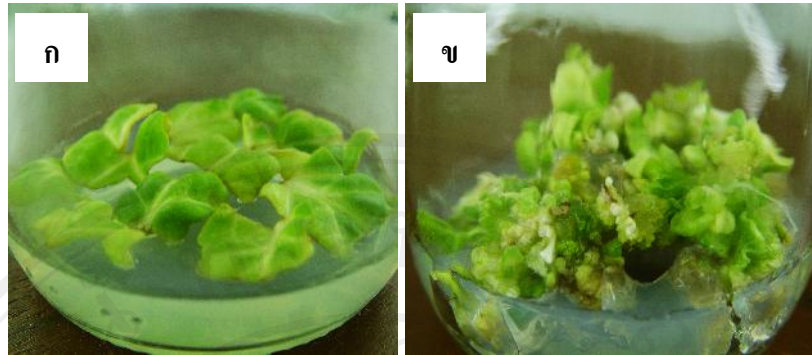
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลของการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Horsch *et al.*, 1985 และ Ingrid, 2006)

เนื่องจากยาสูบและพืทูเนียเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่นิยมนำมาศึกษาการส่งถ่ายยีน และประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายยีน ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงได้ส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของพลาสมิดโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ผลจากการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่า ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดสามารถเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกได้ (ภาพ 4.1 ก และ 4.3 ก) และเมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียจะเริ่มมีการเจริญเป็นแคลลัสและมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ (ภาพ 4.1 ข และ 4.3 ข) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical ในชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดและอยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน พบว่าชิ้นส่วนใบยาสูบเกิดสีฟ้า (ภาพ 4.2 และ 4.4) ส่วนชิ้นส่วนใบยาสูบและพืทูเนียที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่มีเกิดสีฟ้า และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแคลลัสยาสูบและพืทูเนีย รวมไปถึงใบยาสูบและพืทูเนียที่เจริญมาจากแคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด พบว่าเนื้อเยื่อเกิดสีฟ้าเช่นเดียวกัน (ภาพ 4.2 และ 4.4) จากการคำนวณประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบโดยคำนวณจากการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า ประสิทธิภาพการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) เท่ากับ 93 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4.1) ส่วนประสิทธิภาพการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) เท่ากับ 90 และ 83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนทางสถิติจะพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืทูเนียพบว่า พบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) เท่ากับ 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4.2) ส่วนประสิทธิภาพการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) เท่ากับ 97 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนทางสถิติจะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

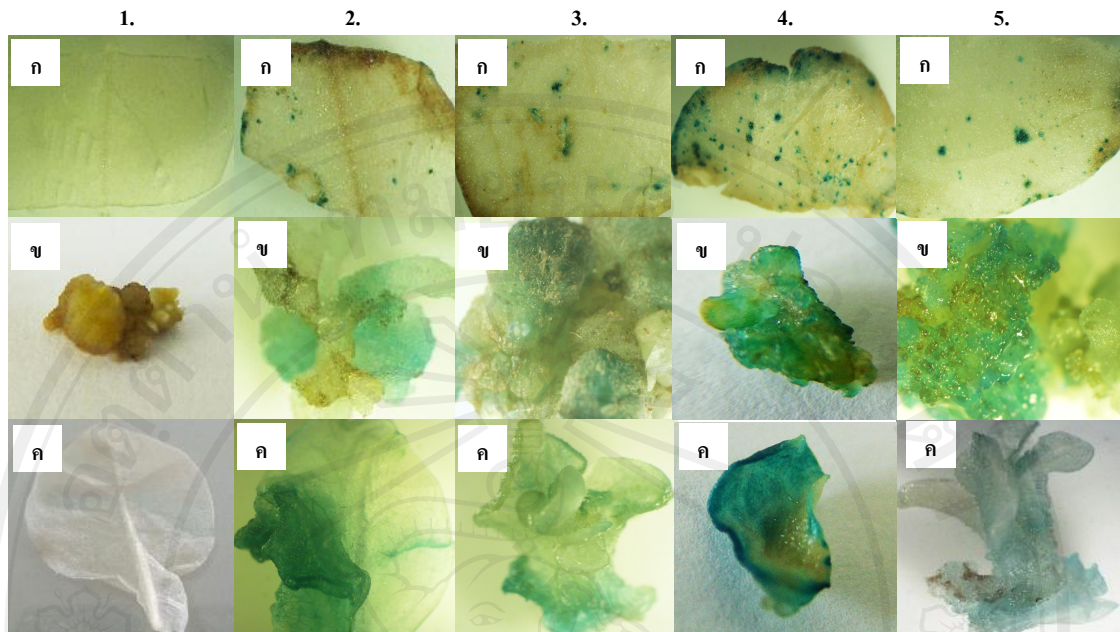


ภาพ 4.1 แสดงผลของการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบ โดย ก) ชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดและเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 2 สัปดาห์ และ ข) ชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดมีการเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่

ตาราง 4.1 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

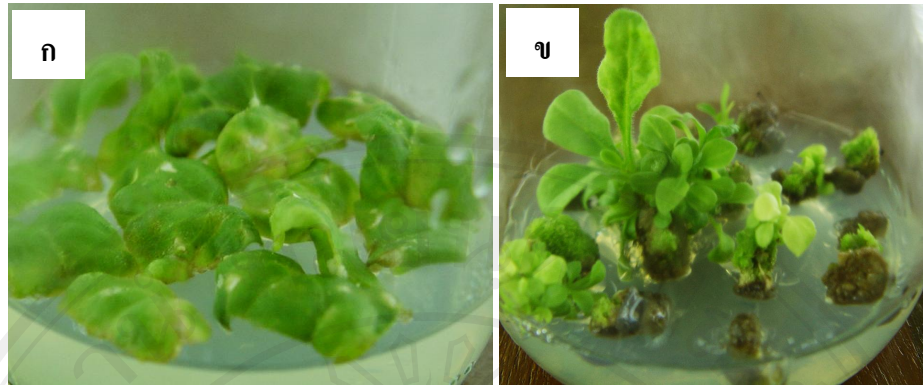
ครั้งที่	การแสดงผลของยีน <i>gus</i> /จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด (% ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน)							
	LBA4404				EHA105			
	pSTART		pBI121		pSTART		pBI121	
	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน
1	93/93(100)	85/90 (94)	102/105(97)	96/100 (96)	98/100(98)	97/100(97)	114/119(96)	88/115(77)
2	90/97 (93)	86/90 (96)	77/86(90)	73/84 (87)	115/119(97)	108/119(91)	98/104(94)	85/99 (86)
3	91/100(91)	88/98 (90)	93/103(90)	88/100(88)	110/112(98)	108/110(98)	106/120(88)	97/110(88)
เฉลี่ย	274/290(94)	259/278(93 ^a)	272/294(93)	257/284(90 ^a)	323/331(98)	313/329(95 ^a)	318/343(93)	270/324(83 ^a)

ตัวอักษรในแถวเดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพ 4.2 แสดงผลของการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical ในเนื้อเยื่อต่างๆของ ยาสูบหลังจากผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

- เนื้อเยื่อต่างๆ ของยาสูบที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด ก) ชิ้นส่วนใบยาสูบ ข) แคลลัสยาสูบ อายุ 2 สัปดาห์ และ ค) ใบที่เจริญมาจากแคลลัสยาสูบ อายุ 4 สัปดาห์
- เนื้อเยื่อต่างๆ ของยาสูบที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) ก) ชิ้นส่วนใบยาสูบในอาหาร คัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสยาสูบ อายุ 2 สัปดาห์ และ ค) ใบที่เจริญมาจากแคลลัส ยาสูบ อายุ 4 สัปดาห์
- เนื้อเยื่อต่างๆ ของยาสูบที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pBI121) ก) ชิ้นส่วนใบยาสูบในอาหาร คัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสยาสูบ อายุ 2 สัปดาห์ และ ค) ต้นกล้าที่เจริญมาจากแคลลัส ยาสูบ อายุ 4 สัปดาห์
- เนื้อเยื่อต่างๆ ของยาสูบที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) ก) ชิ้นส่วนใบยาสูบในอาหาร คัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสยาสูบ อายุ 2 สัปดาห์ และ ค) ใบที่เจริญมาจากแคลลัส ยาสูบ อายุ 4 สัปดาห์
- เนื้อเยื่อต่างๆ ของยาสูบที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pBI121) ก) ชิ้นส่วนใบยาสูบในอาหาร คัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสยาสูบ อายุ 2 สัปดาห์ และ ค) ต้นกล้าที่เจริญมาจากแคลลัส ยาสูบ อายุ 4 สัปดาห์

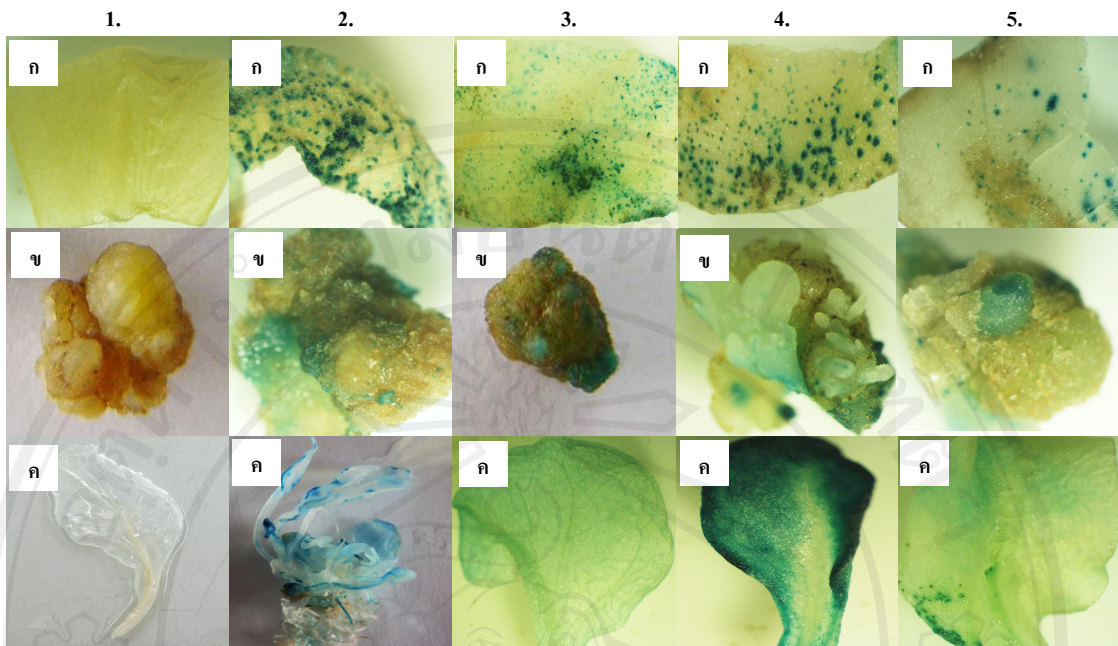


ภาพ 4.3 แสดงผลของการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) เข้าสู่ชิ้นส่วนใบพิทูเนีย โดย ก) ชิ้นส่วนใบพิทูเนียที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดและเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 2 สัปดาห์ และ ข) แคลลัสที่เจริญมาจากชิ้นส่วนของใบที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดและมีการเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่

ตาราง 4.2 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบพิทูเนีย โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ครั้งที่	การแสดงออกของยีน <i>gus</i> /จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด (% ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน)							
	LBA4404				EHA105			
	pSTART		pBI121		pSTART		pBI121	
	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน
1	100/105(95)	85/100 (85)	103/111(93)	87/100 (87)	100/100(100)	95/97(98)	116/119(97)	95/115(83)
2	99/103 (96)	86/98 (88)	94/100(94)	70/90 (77)	119/119(100)	106/110(96)	100/103(97)	93/100(93)
3	99/100(99)	80/96 (83)	94/107(88)	80/98(82)	112/112(100)	105/108(97)	105/119(88)	105/109(96)
เฉลี่ย	298/308(97)	251/294(85 ^a)	291/318(91)	237/288(82 ^b)	331/331(100)	306/315(97 ^c)	321/341(94)	293/324 (90 ^{ab})

ตัวอักษรในแถวเดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



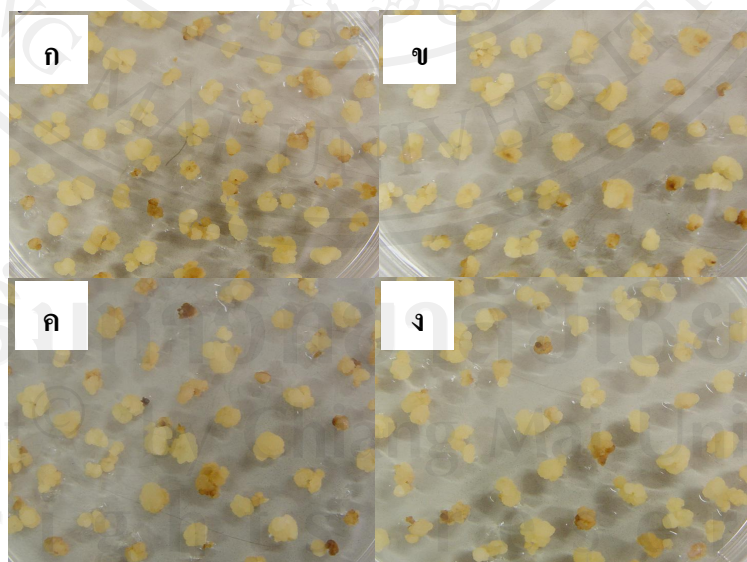
ภาพ 4.4 แสดงผลของการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อพืชเนียบที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้โพรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

1. ก) ชิ้นส่วนใบพืชเนียบ ข) แคลลัสพืชเนียบอายุ 3 สัปดาห์ และ ค) เนื้อเยื่อใบที่เจริญมาจากแคลลัสพืชเนียบที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด
2. การส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) ก) ชิ้นส่วนใบพืชเนียบในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสพืชเนียบ อายุ 3 สัปดาห์ และ ค) เนื้อเยื่อใบที่เจริญมาจากแคลลัสพืชเนียบ อายุ 5 สัปดาห์
3. การส่งถ่าย LBA4404 (pBI121) ก) ชิ้นส่วนใบพืชเนียบในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสพืชเนียบ อายุ 3 สัปดาห์ และ ค) เนื้อเยื่อใบที่เจริญมาจากแคลลัสพืชเนียบ อายุ 5 สัปดาห์
4. การส่งถ่าย EHA105 (pSTART) ก) ชิ้นส่วนใบพืชเนียบในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสพืชเนียบ อายุ 3 สัปดาห์ และ ค) เนื้อเยื่อใบที่เจริญมาจากแคลลัสพืชเนียบ อายุ 5 สัปดาห์
5. การส่งถ่าย EHA105 (pBI121) ก) ชิ้นส่วนใบพืชเนียบในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วัน ข) แคลลัสพืชเนียบ อายุ 3 สัปดาห์ และ ค) เนื้อเยื่อใบที่เจริญมาจากแคลลัสพืชเนียบ อายุ 5 สัปดาห์

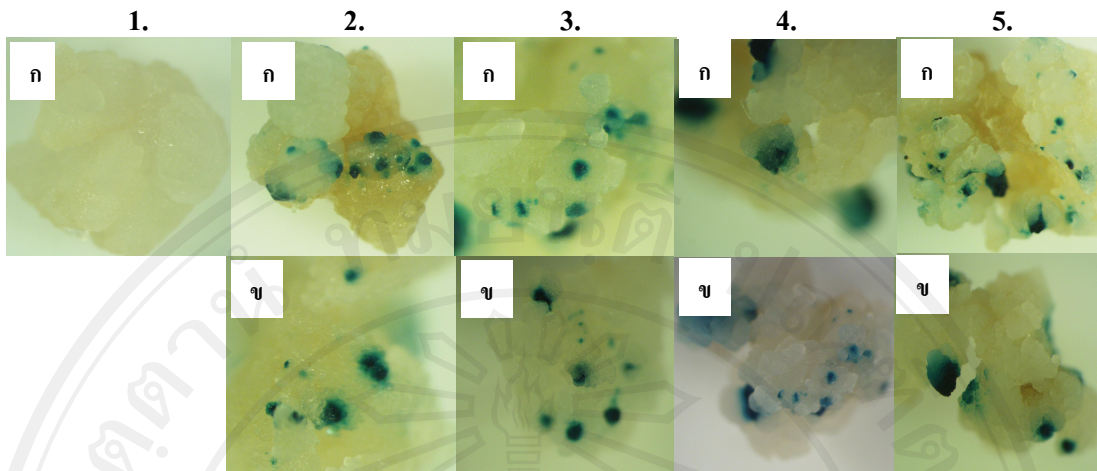
4.2 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เซลล์ข้าวคิตาอิเกะ (kitaake) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Hiei *et al.*, 1994)

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและข้าวกลุ่มจาโปนิกาเป็นข้าวที่มีการศึกษาและรายงานการส่งถ่ายยีนอย่างแพร่หลาย โดยข้าวคิตาอิเกะเป็นข้าวในกลุ่มจาโปนิกา ดังนั้นจึงนำข้าวคิตาอิเกะมาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน โดยการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เซลล์ข้าวคิตาอิเกะโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เซลล์ของข้าวคิตาอิเกะ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่าเซลล์ข้าวคิตาอิเกะสามารถเจริญในอาหารคัดเลือกได้ (ภาพ 4.5) และผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical ในเซลล์ที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดที่อยู่ในอาหารคัดเลือก 7 วันและ 30 วัน พบว่าเซลล์มีการเกิดจุดสีฟ้า (ภาพ 4.6) ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่มีเกิดสีฟ้าจากการคำนวณประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดโดยคำนวณจากการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) เท่ากับ 54 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4.3) ส่วนประสิทธิภาพการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) เท่ากับ 64 และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนทางสถิติจะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพ 4.5 แสดงเซลล์ข้าวคิตาอิเกะที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 4 สัปดาห์
ก) LBA (pSTART) ข) LBA (pBI121) ค) EHA105 (pSTART) และ ง) EHA105 (pBI121)



ภาพ 4.6 แสดงผลของการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical ในแคลลัสข้าว คิตาอิเกะที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

- 1) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด
- 2) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) ก) และ ข) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน
- 3) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pBI121) ก) และ ข) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน
- 4) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) ก) และ ข) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน
- 5) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) ก) และ ข) แคลลัสข้าวคิตาอิเกะที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน

ตาราง 4.3 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวคิตาอิเกะ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ครั้ง ที่	การแสดงออกของยีน <i>gus</i> /จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด (% ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน)							
	LBA4404				EHA105			
	pSTART		pBI121		pSTART		pBI121	
	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน
1	114/134 (85)	78/154 (51)	120/161 (75)	49/152 (32)	130/159 (82)	90/150 (60)	120/150 (80)	45/135 (33)
2	111/130 (85)	85/160 (53)	130/150 (87)	45/145 (31)	141/165 (85)	99/155 (64)	117/140 (84)	40/140 (29)
3	178/229 (78)	87/149 (58)	150/174 (86)	46/164 (28)	139/155 (90)	97/144 (67)	115/139 (83)	44/124 (34)
เฉลี่ย	403/493 (82)	250/463 (54) ^๒	400/485 (82)	140/455 (30) ^๑	410/479 (86)	286/449 (64) ^๑	352/429 (82)	129/399(32) ^๑

ตัวอักษรในแถวเดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.3 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ดัดแปลงจาก Yookongkaew *et al*, 2007)

ข้าวกลุ่มอินดิกาเป็นข้าวที่มีการศึกษาและรายงานการส่งถ่ายยีนค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกลุ่มจาโปนิกา เนื่องจากข้าวบือโปะโละเป็นข้าวกลุ่มอินดิกาและยังไม่มีรายงานการศึกษาการส่งถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์นี้มาก่อนจึงนำมาศึกษาการส่งถ่ายยีน โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละและทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ รวมไปถึงการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ

4.3.1 ผลการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ

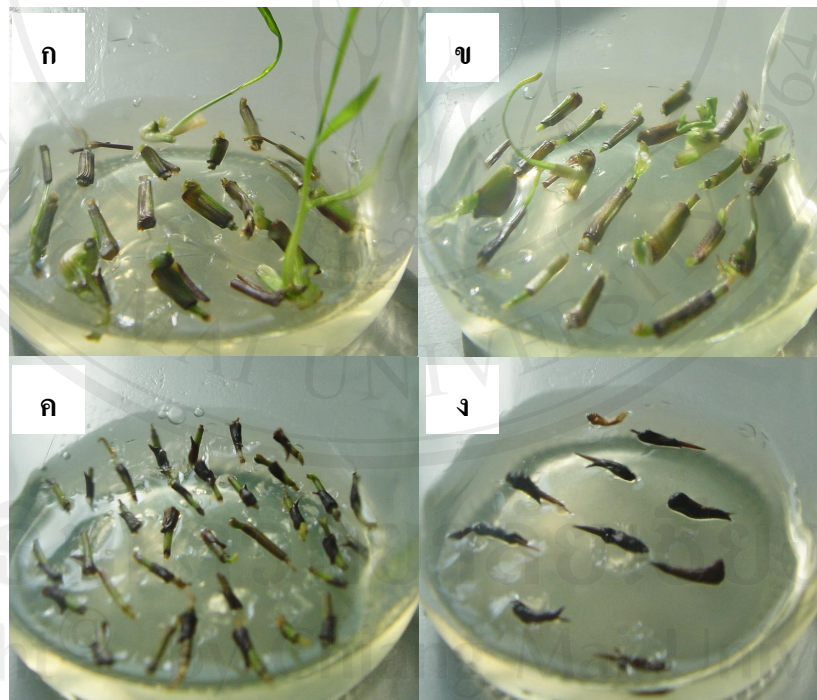
เนื่องจากพลาสมิด pSTART และ pBI121 มียีน *nptII* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อกานามัยซิน (ภาพ 3.1) ซึ่งใช้เป็นยีนคัดเลือก ดังนั้นเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ได้รับพลาสมิดจะสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมกานามัยซินได้ จึงต้องทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละก่อน

จากการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ โดยนำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงในอาหาร MS-TDZ (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเมล็ดมีการงอกจึงตัดส่วนรากและส่วนยอดออกโดยให้เหลือแต่ส่วนที่เป็นฐานของยอดประมาณ 3-4 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MS-TDZ ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 50 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำและตายในที่สุด โดยเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละตายทั้งหมดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพ 4.7) ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละมีเปอร์เซ็นต์รอดเท่ากับ 80 และ 46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4.4) ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมกานามัยซินจะทำให้เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละมีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 4.4 แสดงความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ

กานามัยซินเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเนื้อเยื่อปลายยอดที่รอด/จำนวนเนื้อเยื่อปลายยอดทั้งหมด (% การรอดของเนื้อเยื่อปลายยอด)
0	138/150(92 ^d)
50	120/150(80 ^c)
75	69/150(46 ^b)
100	0/150(0 ^a)

ตัวอักษรในคอลัมน์เดียวกันที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

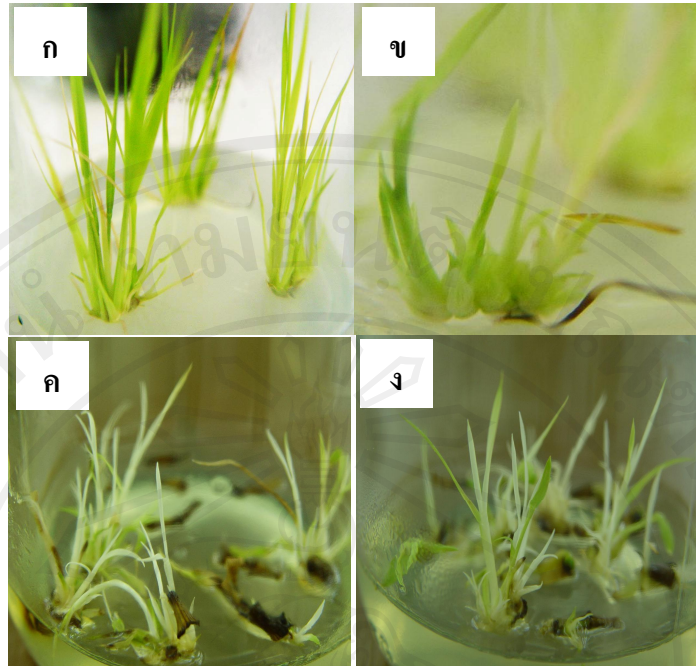


ภาพ 4.7 แสดงเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะ โละที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดย ก) กานามัยซิน 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) กานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) กานามัยซินความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ง) กานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3.2 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

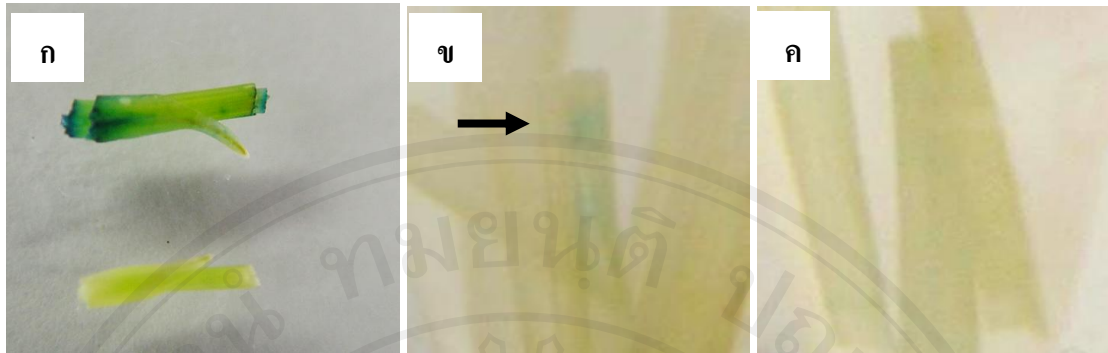
ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) สามารถเจริญในอาหารคัดเลือกได้ และเมื่อย้ายไปในอาหารที่ชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ (ภาพ 4.8) ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) สามารถเจริญในอาหารคัดเลือกได้แต่เมื่อย้ายไปในอาหารที่ชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่พบที่เกิดเป็นต้นใหม่ที่มีสีขาว (ภาพ 4.8) เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) เกิดสีฟ้า (ภาพ 4.9) ส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) ไม่เกิดสีฟ้า

ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนโดยคำนวณจากการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) เท่ากับ 0.5 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4.5) และการตรวจสอบยีน *gus* โดยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 500 คู่เบสในต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) (ภาพ 4.10) ส่วนต้นข้าวที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่มีการเกิดแถบดีเอ็นเอเลย



ภาพ 4.8 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้โอะโกะแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ในอาหารคัดเลือก 4 สัปดาห์

- ก) เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) อายุ 4 สัปดาห์
- ข) เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pBI121) อายุ 4 สัปดาห์
- ค) เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) อายุ 4 สัปดาห์
- ง) เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) อายุ 4 สัปดาห์

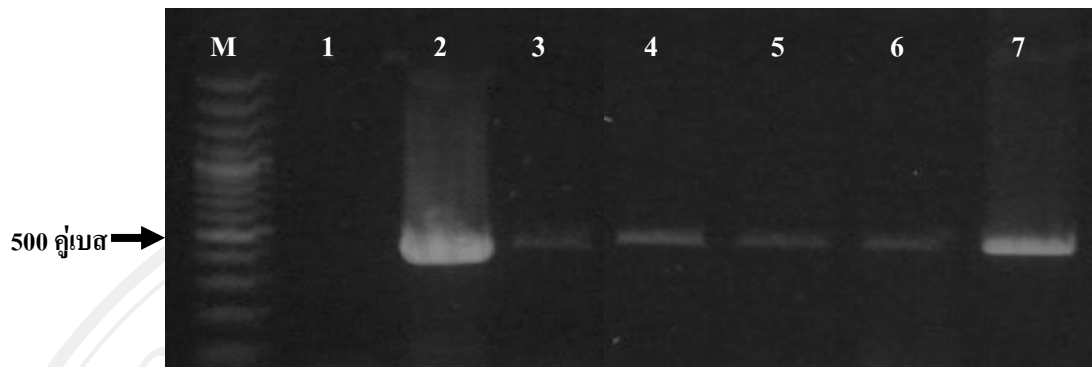


ภาพ 4.9 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ EHA105 (pSTART)

- ก) เนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) (บน) และ EHA105 (pSTART) (ล่าง) ที่อยู่บนอาหารคัดเลือก 7 วัน
- ข) ใบข้าวบือโปะโละที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อปลายยอดที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) อายุ 6 สัปดาห์
- ค) ใบข้าวบือโปะโละที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อปลายยอดที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) อายุ 6 สัปดาห์

ตาราง 4.5 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 ในเนื้อเยื่อปลายยอดข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ครั้งที่	เนื้อเยื่อปลายยอดที่เกิดสีฟ้า/เนื้อเยื่อปลายยอดที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนทั้งหมด			
	LBA4404		EHA105	
	pSTART	pBI121	pSTART	pBI121
1	1/200(0.5)	1/200(0.5)	0/200(0)	0/200(0)
2	2/200(1)	0/200(0)	0/200(0)	0/200(0)
3	0/200(0)	0/200(0)	0/200(0)	0/200(0)
4	1/200(0.5)	0/200(0)	0/200(0)	0/200(0)
เฉลี่ย	0.5	0.1	0	0



ภาพ 4.10 แสดงการตรวจสอบยีน *gus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121)

ช่อง M) 100 bp leader marker

ช่อง 1) ดีเอ็นเอของต้นข้าวบือโปะโละที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด

ช่อง 2) พลาสมิด pSTART

ช่อง 3-5) ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART)

ช่อง 6) ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pBI121)

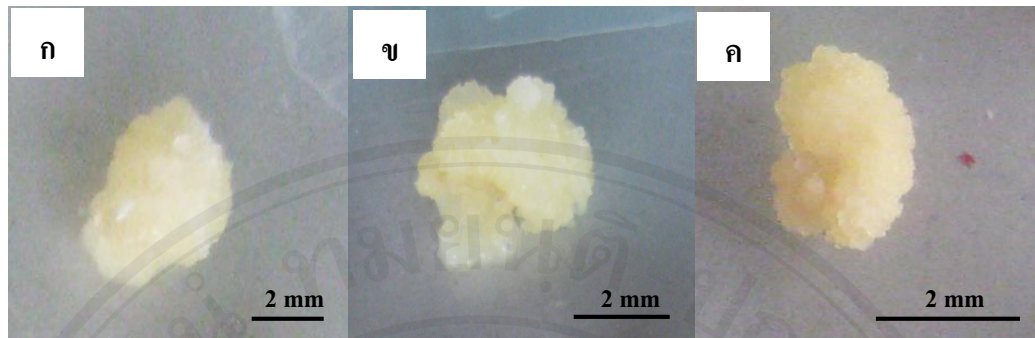
ช่อง 7) พลาสมิด pBI121

4.4 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

การศึกษากการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละ จะการศึกษาสูตรอาหารในการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เกิดแคลลัส การทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสและการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ จากนั้นส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

4.4.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 D ในการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เกิดแคลลัส

จากการศึกษากการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSD (ภาคผนวก ข) ที่เติม 2,4 D ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมล็ดข้าวมีการเกิดแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MSD ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และพบว่าความเข้มข้นของ 2,4 D ที่ 4 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เกิดแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4.6) รองลงมาคือ ความเข้มข้นของ 2,4 D ที่ 6 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้เกิดแคลลัสเท่ากับ 95 และ 91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเมล็ดข้าวที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้เติม 2,4 D (ความเข้มข้น 2,4 D ที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะไม่มีการเกิดแคลลัสเลย นอกจากนี้ แคลลัสที่ชักนำในอาหารที่มีการเติม 2,4 D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีลักษณะเป็นสีเหลืองและมีลักษณะเป็นไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) คือมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ และฟู (ภาพ 4.11) ส่วนแคลลัสที่ชักนำในอาหารที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะพบว่าแคลลัสจะเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกันแต่จะเป็นลักษณะแบบคอมแพค (compact callus) คือ เกาะกันแน่นเป็นก้อน ส่วนแคลลัสที่ชักนำในอาหารที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสที่มีสีเหลืองอมน้ำตาล ลักษณะคอมแพค



ภาพ 4.11 แสดงการเกิดแคลลัสของข้าวบือโปะโละในอาหารที่เติม 2,4 D ความเข้มข้นต่างๆ

- ก) แคลลัสข้าวบือโปะโละในอาหารที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ข) แคลลัสข้าวบือโปะโละในอาหารที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ค) แคลลัสข้าวบือโปะโละในอาหารที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตาราง 4.6 แสดงความเข้มข้นของ 2,4 D ต่างๆ ที่มีผลในการชักนำเมล็ดข้าวบือโปะโละให้เกิดแคลลัส

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ดข้าว	% การเกิดแคลลัส
0	100	0
2	100	91
4	100	98
6	100	95

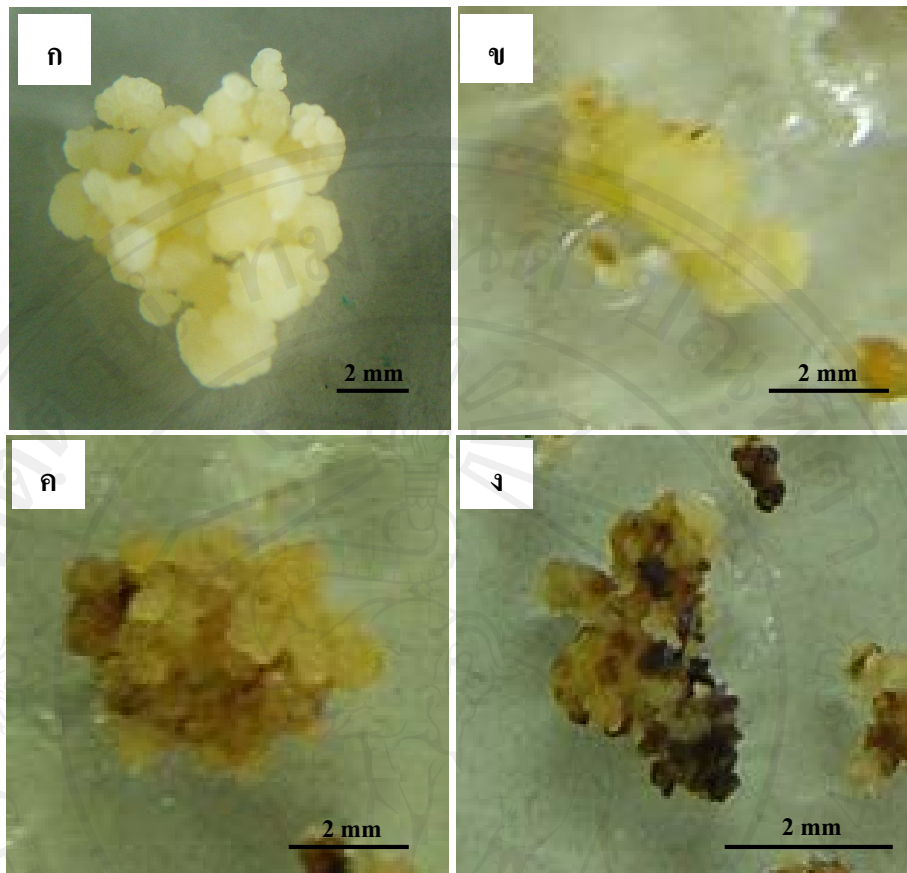
4.4.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวบือโปะโละ

เนื่องจากพลาสมิด pSTART และ pBI121 มียีน *nptII* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อกานามัยซิน (ภาพ 3.1) ซึ่งใช้เป็นยีนคัดเลือก ดังนั้นแคลลัสข้าวบือโปะโละที่ได้รับพลาสมิดจะสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการเติมกานามัยซินได้ จึงต้องทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวบือโปะโละก่อน

นำแคลลัสข้าวบือโปะโละมาทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวบือโปะโละ โดยการเติมกานามัยซินความเข้มข้น 0 50 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหาร MSD ที่มี 2,4 D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากการทดลองที่ 4.4.1) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้แคลลัสข้าวบือโปะโละเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลได้ทั้งหมดแต่จะทำให้แคลลัสข้าวบือโปะโละชะงักการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวบือโปะโละในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้แคลลัสเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้มและชะงักการเจริญเติบโต (ภาพ 4.12) โดยแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้แคลลัสเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้มมากที่สุด คือ 42 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4.7) รองลงมาคือแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้ม 12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่มีผลทำให้แคลลัสเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นสีน้ำตาลเข้มและแคลลัสยังสามารถเจริญได้ตามปกติ

ตาราง 4.7 แสดงความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสข้าวบือโปะโละ

กานามัยซินเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	%การเกิดสีของแคลลัส		
	เหลือง	เหลืองเข้มถึงน้ำตาล	น้ำตาลเข้ม
0	100	0	0
50	100	0	0
100	68	20	12
150	28	30	42



ภาพ 4.12 แสดงลักษณะของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้นต่างๆ
 ก) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมการนามัยซินความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์
 ข) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมการนามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์
 ค) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมการนามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์
 ง) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมการนามัยซินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์

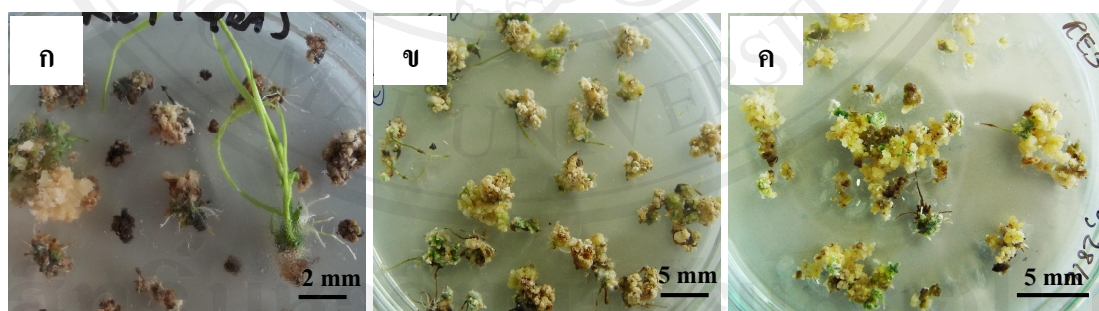
4.4.3 ผลของการชักนำแคลลัสปอโปะโละให้เจริญเป็นต้นใหม่

การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นเป็นกระบวนการที่สำคัญในการส่งถ่ายยีน ซึ่งสูตรอาหารที่ใช้ต้องมีความเหมาะสมด้วย โดยการศึกษาได้นำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารที่จะชักนำให้ให้เจริญเป็นต้นใหม่สูตรต่างๆ คือ RE1 (คัดแปลงจาก Samiphak and Siwarungson, 2006) RE2 (คัดแปลงจาก Zaidi *et al*, 2006) และ RE3 (คัดแปลงจาก Lin and Zhang, 2005) (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์และย้ายอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกการเกิดจุดเขียวและการเกิดต้น พบว่าแคลลัสมีการเกิดจุดเขียวเมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ในทุกสูตรอาหารและเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4

สัปดาห์ นำมาคำนวณการเกิดจุดเขียวของแคลลัส พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE1 จะมีการเกิดจุดเขียวมากที่สุดเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4.8) รองลงมาคือแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE3 ซึ่งจะมีการเกิดจุดเขียวเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE2 จะมีการเกิดจุดเขียวเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้จะพบว่า อาหารสูตร RE1 สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารสูตร RE2 และ RE3 ไม่สามารถชักนำแคลลัสที่เกิดจุดเขียวให้พัฒนาไปเป็นต้นได้ (ภาพ 4.13)

ตาราง 4.8 แสดงการเกิดจุดเขียวและการเจริญเป็นต้นของแคลลัสข้าวบือโปะโละที่ชักนำในอาหารสูตร RE1 RE2 และ RE3

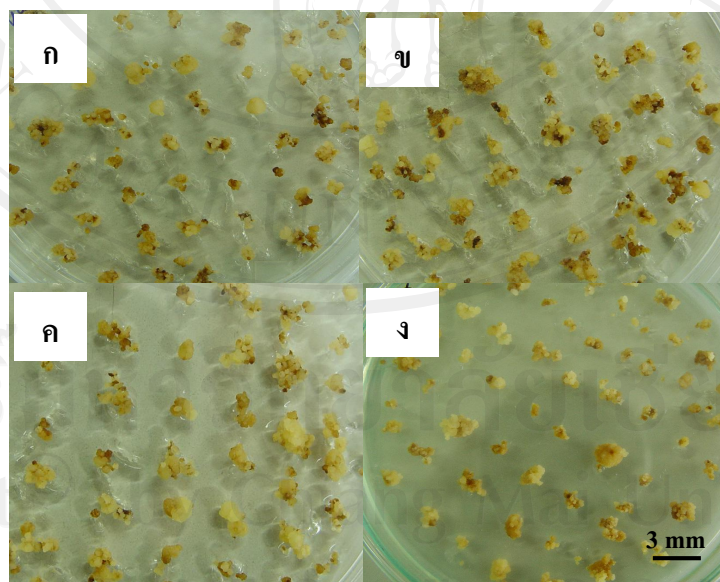
สูตรอาหาร	% การเกิดจุดเขียวของแคลลัส	% การเกิดต้น
RE1	84	5
RE2	72	0
RE3	80	0



ภาพ 4.13 แสดงลักษณะของแคลลัสข้าวบือโปะโละที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่สูตรต่างๆ ก) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE1 อายุ 10 สัปดาห์ ข) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE2 อายุ 10 สัปดาห์ และ ค) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร RE3 อายุ 10 สัปดาห์

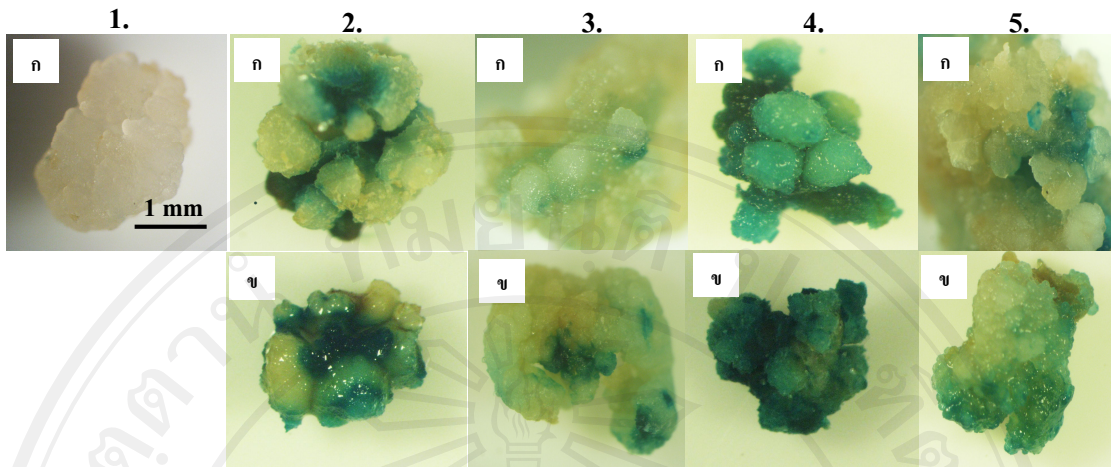
4.4.4 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 เข้าสู่แคลลัสของข้าวบือโปะโละ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 พบว่า แคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดสามารถเจริญในอาหารคัดเลือกได้ (ภาพ 4.14) จากการทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical พบว่า แคลลัสที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดที่อยู่ในอาหารคัดเลือก 7 วัน และ 30 วันพบว่าแคลลัสมีการเกิดสีฟ้า (ภาพ 4.15) ส่วนแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่มีอาการเกิดสีฟ้า จากการคำนวณประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิดโดยคำนวณจากการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า ประสิทธิภาพการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) และ LBA4404 (pBI121) เท่ากับ 42 และ 32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4.9) ส่วนประสิทธิภาพการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) และ EHA105 (pBI121) เท่ากับ 49 และ 34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนทางสถิติจะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการตรวจสอบยีน *gus* โดยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 500 คู่เบสในต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด (ภาพ 4.16) ส่วนต้นข้าวที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิดจะไม่มีอาการเกิดแถบดีเอ็นเอเลย



ภาพ 4.14 แสดงแคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ก) LBA (pSTART) ข) LBA (pBI121) ค) EHA105 (pSTART) และ ง) EHA105 (pBI121)

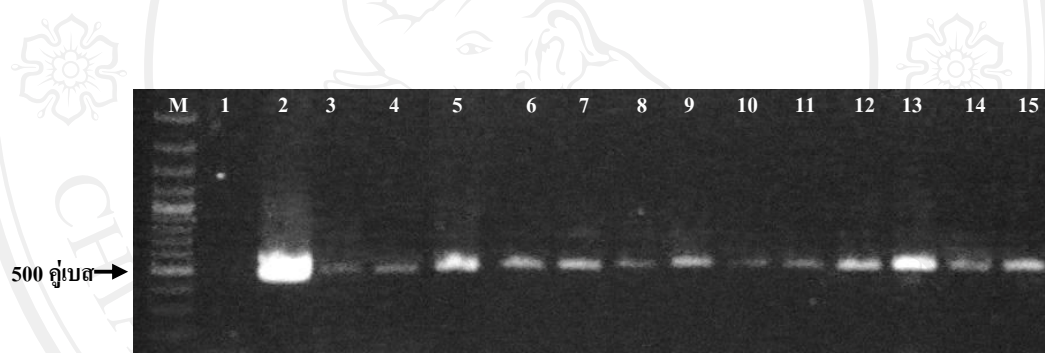


ภาพ 4.15 แสดงผลของการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical ในแคลลัสข้าว บือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้โอะโรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

- 1) แคลลัสข้าวบือโปะโละที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด
- 2) แคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART) ก) และ ข) แคลลัสบือโปะโละที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน
- 3) แคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pBI121) ก) และ ข) แคลลัสบือโปะโละที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน
- 4) แคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) ก) และ ข) แคลลัสบือโปะโละที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน
- 5) แคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART) ก) และ ข) แคลลัสบือโปะโละที่อยู่ในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 7 วันและ 30 วัน

ตาราง 4.9 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 ในเซลล์ข้าวบือโปะโละ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105

ครั้งที่	การแสดงผลของยีน <i>gus</i> /จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด (% ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน)							
	LBA4404				EHA105			
	pSTART		pBI121		pSTART		pBI121	
	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	30 วัน
1	156/187(83)	38/88(43)	112/176(63)	23/73(32)	188/201(94)	44/93(47)	171/190(90)	24/76(32)
2	110/121(91)	30/75(40)	120/156(77)	21/75(28)	154/172(90)	40/83(48)	111/135(82)	24/69(35)
3	112/120(93)	38/89(43)	115/150(77)	30/80(38)	160/180(89)	49/96(51)	120/150(80)	29/81(36)
เฉลี่ย	378/428(88)	106/252(42) ^b	347/482(72)	74/228(32) ^c	502/553(91)	133/272(49) ^b	402/475(85)	77/226(34) ^c



ภาพ 4.16 แสดงการตรวจสอบยีน *gus* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในเซลล์ข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 (ช่อง M) 100 bp leader marker

ช่อง 1) ดีเอ็นเอของเซลล์ข้าวบือโปะโละที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายพลาสมิด

ช่อง 2) พลาสมิด pSTART

ช่อง 3-4) ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pSTART)

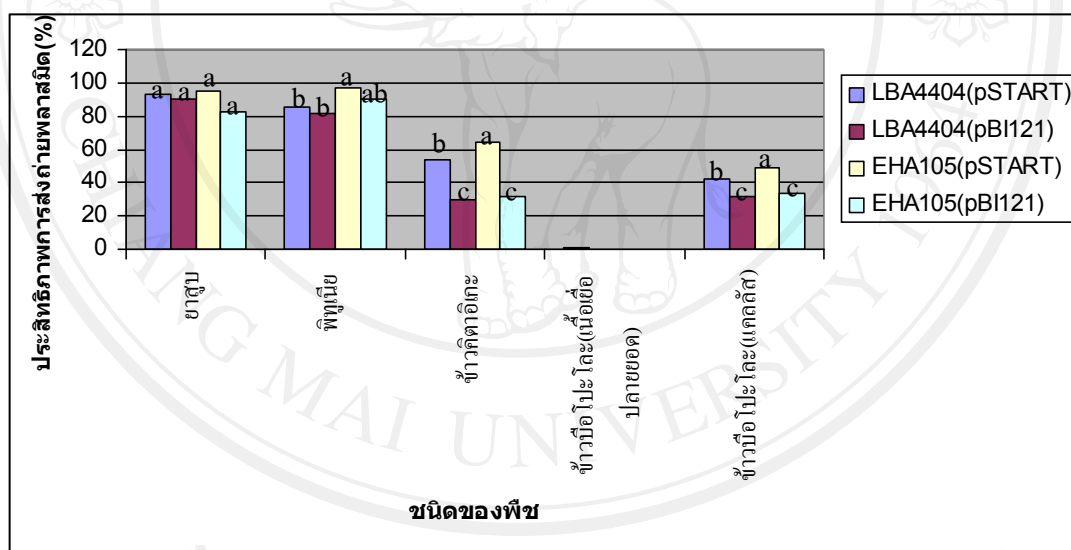
ช่อง 5) พลาสมิด pBI121

ช่อง 6-7) ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย LBA4404 (pBI121)

ช่อง 8-11) ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pSTART)

ช่อง 12-15) ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการส่งถ่าย EHA105 (pBI121)

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 ในพืชทดลอง คือ ยาสูบ พิทูเนีย ข้าวคิตาอิเกะ และข้าวบือโปะโละ พบว่า สามารถส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบและพิทูเนียซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ได้ดี โดยประสิทธิภาพการส่งถ่ายสูงสุดเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 4.17) ซึ่งมากกว่าการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แคลลัสข้าวคิตาอิเกะ โดยมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายสูงสุดเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แคลลัสข้าวบือโปะโละ ซึ่งมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายสูงสุดเท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของข้าวบือโปะโละจะมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายต่ำมากที่สุดเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถชักนำแคลลัสข้าวบือโปะโละที่ผ่านการส่งถ่าย พลาสมิดให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้



ภาพ 4.17 แสดงประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART และ pBI121 โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เข้าสู่ยาสูบ พิทูเนีย ข้าวคิตาอิเกะ และข้าวบือโปะโละ ตัวอักษรบนกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)