T160256

บทคัดย่อ

ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงให้ต้านทานต่อโรคใบด่างขีดโดยเทคนิคพันธุวิศกรรม เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบต่าง ๆ อย่างน้อย 3 ระบบได้แก่ (1) การสร้างชุดของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ peanut stripe Potyvirus(PStV-CP gene) ให้อยู่เป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลดีเอ็นเอพาหะสำหรับการส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ถั่วลิสง และทำให้ยีนถูกแสดงออกได้ในเซลล์ถั่วลิสง (2) การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงที่ชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อนและต้นที่สมบูรณ์ได้สำหรับรองรับกระบวนการถ่ายยีน และ (3) การพัฒนาวิธีการส่งถ่ายยีน ในการวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาทั้ง 3 ระบบเพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการนำไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ที่แนะนำให้ปลูกในประเทศไทยโดยเทคนิคการถ่ายยีน ดังต่อไปนี้ (1) ได้ชุดของยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ PStV ที่มีส่วน initiation codon สอดแทรกอยู่ใน *E.coli* protein expression vector pET-15b (pET-15b::CP construct) ถึงแม้ว่ายังต้องพัฒนาต่อไปในการสอดแทรกเข้าไปในส่วนของ plant expression vector pBI121 (pBI121:: CP construct) (2) สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงที่เหมาะสม คือ อาหารดัดแปลง MS ที่มีวิตะมิน B5 น้ำตาลซูโครส 2 % วุ้น 8 กรัมต่อลิตร มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มก.ต่อลิตร และ BA 3 มก.ต่อลิตร pH 5.8 สภาพในการเพาะเลี้ยงคือ มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้อง 25-28 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนโคนใบอ่อน และ hypocotyl พัฒนาแคลลัสและต้นอ่อนได้ภายใน 1-2 เดือน เนื้อเยื่อจากเอมบริโอมีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด พันธุ์ไทนาน 9 พันธุ์ และKKU72-2 มีการเจริญพัฒนาได้ดีในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (3) การส่งถ่ายยีน *NPT-II*-GUS เข้าสู่เนื้อเยื่อเนื้อเยื่อเอมบริโอที่เพาะไว้ในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 วันโดยใช้ *A. tumefaciens* –pBI121 vector ร่วมกับการใช้ ultrasonication 1-2 นาที เหมาะสมมากที่สุด มีจำนวนต้นอ่อนที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มีกานามัยซิน 50 มก.ต่อลิตร โดยพัฒนาจากเนื้อเยื่อส่วนโคนยอดเดิมและส่วนส่วน hypocotyl พันธุ์ไทนาน 9 มีแนวโน้มในการรับการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะได้ง่ายกว่าพันธุ์ KKU72-2

Abstract TE 160256

In the process for improvement of peanut varities resistant to peanut stripe disease by genetic engineering approach, at least three systems have been involved, including (1) Contruction of coat protein gene of peanut stripe *Potyvirus*(PStV-CP gene) into vector DNA molecule for transfering such gene into peanut cells and be expressed within peanut cells correctly. (2) Development of peanut tissue culture medium suitable for regeneration the plantlets and mature plant growth from peanut tissues. (3) Transformation system for peanut tissues. These required three systems have been accomplished in this research project for further applied to the peanut varieties improvement in Thailand via gene transfer technique, as follows: (1) the construction of PStV-CP gene with initation codon into protein expression vector in *E. coli* cells , pET-15b (pET-15b::CP construct) was obtained , although further development would be required for insertion into plant expression vector , pBI121 (pBI121::CP construct) , (2) the best formulation for peanut tissue culture medium was modified MS with vitamin B5, sucrose 2% , agar 8 g/liter, NAA 1 mg/ l, DA 2 mg/l , pH 5.8 . The optimal growth condition was day-light 16 hr/day, temperature range from 25-28 ° C. The small plantlets were regenerated from the basal of young leaflet and hypocotly of young plant (3-7 days old) within 1-2 moths culture, The Tainan 9 and KKU72-2 varieties were actively responsed to tissue culture system. (3) For transfering cassette of NPT-II-GUS gene by A. tumefaciens –pBI121 vector , using mature embro germinated in strile condition 3 days prior transformation and combination of sonication at 1-2 min with *A. tumefacines*-pBI121 vector suspension, showed the highest number of green small plantlets resistant to kanamycin 50 mg / l selection medium. The obtained plantlets regenerated from swolien basal part of original shoot and various section of hypocotyi tissues. The peanut Tainan 9 variety was tend to be more acceptable for transformation by *A. tumefacines* than KKU72-2 variety.