

วิชา สิ่งหล่อ 2555: การถ่ายยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตเข้าสู่สนับดำ (*Jatropha curcas* L.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 76 หน้า

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสสนับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล โดยศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และแคลลัสสนับดำ การทดสอบความเข้มข้นของเชื้อ ($OD_{600}=1$) จากการเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อในสัดส่วนต่างๆ ได้แก่ 1:0 1:1 1:10 1:20 1:50 และ 1:100 ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ 10 20 30 และ 40 นาที และระยะเวลาเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 1 2 3 และ 4 วัน พบว่า สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังจากการถ่ายยีน และวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สนับดำ คือการใช้สัดส่วนการเจือจางของสารแขวนลอยเชื้อที่ 1:20 ระยะเวลาปลูกเชื้อ 30 นาที และเลี้ยงร่วมกับเชื้อนาน 2 วัน โดยให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการอื่นที่ทดสอบ

การถ่ายยีน EPSPs เข้าสู่แคลลัสสนับดำโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ที่มียีน EPSPs เป็นยีนคัดเลือก โดยนำปัจจัยที่เหมาะสมจากการศึกษาเบื้องต้นมาใช้ในการถ่ายยีน พบว่า มีแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่มีสารไกลโฟเสตความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9 โคลน จากนั้นนำแคลลัสที่รอดชีวิตมาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแคลลัสที่มียีน EPSPs จำนวน 3 โคลน ซึ่งเมื่อนำมาขึ้นย่นผลการมีอยู่ของยีน EPSPs ที่ถูกถ่ายเข้าไปในแคลลัสด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization พบว่าเป็นยีน EPSPs จริง