เยาวพรรณ สนธิกุล 2557: การถ่ายยีนเข้าสู่สัก (*Tectona grandis* L.f.) โดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 141 หน้า

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยในการวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก ซึ่งพบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากเนื้อเยื่อสักได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงข้อ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เฉลี่ย 5 ยอดต่อข้อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนในสัก โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่ OD_{600}=1 เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้อที่สร้างบาดแผลโดยการ sonication นาน 10 วินาที ปลูกเชื้อนาน 5 ชั่วโมง และเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อนาน 3 วัน เป็นวิธีการถ่ายยีนในสักที่มีประสิทธิภาพสูง จึงใช้วิธีการนี้ถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (*5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase*; *EPSPs*) เข้าสู่สัก โดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ซึ่งมียีน *EPSPs* และคัดเลือกต้นสักที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนจากความทนทานต่อสารไกลโฟเสทในอาหารคัดเลือก ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* โดยเทคนิค PCR ในต้นสักที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกรุ่น T_0 จำนวน 27 ต้น พบการมีอยู่ของยีน *gus* และยีน *EPSPs* จำนวน 23 ต้น เพิ่มปริมาณยอดสักบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จนได้เป็นยอดรุ่น T_2 แล้วตรวจสอบการถ่ายทอดของยีนในรุ่น T_2 โดยเทคนิค PCR พบว่ามีจำนวน 12 ต้น จาก 109 ต้น ที่มียีนที่สนใจ ซึ่งเมื่อนำต้นออกปลูก และตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization, PCR และ Southern blot hybridization พบว่ามีจำนวน 4 ต้น ที่ได้รับการถ่ายทอดยีน แต่มีความสามารถในการทนทานต่อสารไกลโฟเสทไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบการเกิดลักษณะ chimera ในต้นรุ่น T_2

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์