240377

ชื่อเรื่อง	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม
ชื่อผู้เขียน	นางสาวชมนาด เจนจิตรศิลป์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถทำได้ในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำโดยอะโกรแบคทีเรียม จำเป็นต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำพันธุ์เผชิญ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของสบู่ดำบนอาหารที่มี TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้ดี โดย cotyledon ให้การเกิดยอดได้สูงที่สุด 90.48 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้ต้นสบู่ดำมีการยืดยาวบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่ำที่สุด 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยับยั้งการเกิดแคลลัส และทำให้ใบตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกานามัยซิน ความเข้มข้น 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของก้านใบ และ hypocotyls ของ สบู่ดำได้ จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้คัดเลือกสบู่ดำหลังการถ่ายยีน นอกจากนี้ สารปฏิชีวนะไทเมนทิน และซีโฟแทกซิมที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดอะโกรแบคทีเรียมหลังการถ่ายยีนโดยไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัส คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำ ความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่ OD_{600} มีค่า 0.45 เหมาะสมต่อการถ่ายยีน ร่วมกับความเข้มข้นของอะซิโตไซริงโกนที่ 200 ไมโครโมลาร์ และใช้ พลาสมิด pCAMBIA2301 ที่มียีน *nptII* เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และมียีนรายงานผล คือ ยีน *gus* โดยชิ้นส่วนที่มีประสิทธิภาพต่อการถ่ายยีนมากที่สุด คือ cotyledon จากนั้นนำแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซินมาทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า มียีน *gus* แทรกอยู่ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ระบบการถ่ายยีนในสบู่ดำที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนและกระบวนการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของสบู่ดำ และนำไปประยุกต์ใช้ถ่ายยีนสำคัญที่ควบคุมลักษณะที่เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจในสบู่ดำได้ในอนาคต

240377

Title	The Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer in *Jatropha curcas*
Author	Miss Chommanard Jangitsilp
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Chotipa Sakulsingharoj

ABSTRACT

Agrobacterium-mediated transformation is a highly efficient method for genetic improvement of many crop plants. However, the optimization of transformation system of *Jatropha curcas* needs to be performed to increase its efficiency. In this research, tissue culture and transformation systems of *J. curcas* cv. Pachean were studied. The results showed that 1 mg/l TDZ provided the high percentage of callus induction and multiple shoot formation from several types of explants. Cotyledons provided the best shoot formation of 90.48 percent. The concentration of 0.1-0.5 mg/l BA could promote elongation of regenerated shoots. The study of antibiotic resistance of *J. curcas* was conducted. It was found that the lowest concentration of hygromycin at 5 mg/l inhibited callus induction and completely killed all explants tested. The concentration of kanamycin at 50-100 mg/l inhibited callus growth and can be used for the selection of transformed plants in transformation procedure. The suitable concentrations of timentin and cefotaxime used to kill *Agrobacterium* after transformation with no inhibitory effects on callus growth were 50 and 500 mg/l, respectively. The optimization of transformation system of *J. curcas* was performed to increase its efficiency. The highest transformation efficiency was achieved using 0.45 OD_{600} concentration of *Agrobacterium* harboring pCAMBIA2301 which carries *nptII* as selectable marker gene and *gus* as reporter gene. For infection and co-culture, 200 µM acetosyringone gave the maximum percentage of transient *gus* expression. In addition, the cotyledon was the most susceptible to *Agrobacterium* infection. PCR analysis of genomic DNA extracted from kanamycin resistant calli demonstrated the presence of *gusA* gene in all transgenic calli tested. The transformation system developed in this study will be useful for genetic improvement, transgenic approach to understand gene functions and molecular biological processes of *J. curcas* and also transformation of important genes that control beneficial characteristics into *J. curcas* in the future.