

การศึกษาถึงผลของปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพต่อการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และเครื่องยิงอนุภาค พบว่า ความเข้มข้นของซีโฟทาสิมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และส่งเสริมการเจริญ และพัฒนาการของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้คือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนคือที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สายเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายยีนคือ สายเชื้อ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ยีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก และการใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์จุ่มแช่สารละลายเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ปรับความหนาแน่นเชื้อที่ค่า OD600 เป็น 0.8 อินคิวเบชัน 6 ชั่วโมง ให้การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ในกรณีการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงยีน พบว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปล้ำมน้ำมันอายุ 4 สัปดาห์บนอาหารออสโมติคัมเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการยิงยีน โดยกำหนดแรงดันสูญญากาศ -0.1 เมกะปาสกาล แรงดันก๊าซฮีเลียม 5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และปรับระยะห่างระหว่างหัวกระสุนและเป้าหมาย 10 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *gus* และแคลลัสที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินสูงสุด เมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* และ *hpt II* โดยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) พบว่ามีการปรากฏของยีน *gus* ขนาด 441 คู่เบส และ *hpt II* ขนาด 800 คู่เบส

Physical and biological factors affecting gene transformation by *Agrobacterium*-mediated or particle bombardment were investigated. The results showed that concentration of cefotaxime at 200 mg/l was suitable for inhibition overgrowth of *Agrobacterium*. Hygromycin at 30 mg/l inhibited growth of the callus completely so it was a suitable for selection transformed embryogenic callus. *Agrobacterium* strain AGL-1 containing plasmid pCAMBIA1304 which carrying the *gus* and *hpt* as screenable and selectable marker genes, respectively, gave the best transformation efficiency. The age of embryogenic callus (EC) at 4 weeks after subculture inoculated in *Agrobacterium* solution at density of 0.8 (OD600) for 6 hours gave the highest transient expression of *gus* gene. In case of gene transformation by particle bombardment, optimal conditions for gene transformation in EC (4 weeks after subculture to fresh medium) were pre-cultured on osmoticum medium for 16 hours before bombardment. Bombardment was carried out at a reduced air pressure of -0.1 MPa, helium pressure of 5 kg/cm² and working distance (distance from microcarrier to target tissue) of 10 cm. Those conditions gave the highest *gus* expression and percentage of hygromycin resistant calli. Polymerase chain reaction (PCR) analyses of transgenic tissue confirmed the presence of *gus* gene at size of 441bps and *hpt* at size of 800 bps