กตัญญุฑิตา ดำช่วย 2554: การถ่ายยีน (*E*)-ß-farnesene synthase จากสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.) เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, Ph.D. 82 หน้า

การถ่ายยีน (*E*)-ß-farnesene synthase (*TSPA11*) ซึ่งควบคุมการสร้างสาร (*E*)-ß-farnesene ที่สะระแหน่ผลิตขึ้นเพื่อเลียนแบบฟีโรโมนเตือนภัยในเพลี้ยอ่อนเข้าสู่ยาสูบ ยีน *TSPA11* จาก RNA รวมที่สกัดจากใบของสะระแหน่ ถูกสังเคราะห์ผ่าน cDNA และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR จากฟอร์เวอร์สไพรเมอร์ FarX1 และ รีเวอร์สไพรเมอร์ Far2B ที่ได้เพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI ที่ปลาย 5′ ของไพรเมอร์ทั้งคู่ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เชื่อมเข้ากับโคลนนิ่งเวคเตอร์ PCR®8/GW/ TOPO® และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าชิ้นยีน *TSPA11* มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,662 คู่เบส ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนขนาด 553 หน่วย ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *TSPA11* ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank จึงได้สร้างไบนารี่เวคเตอร์ pCAMBIA23Far โดยตัดย่อยยีน *TSPA11* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI จากโคลนนิ่งเวคเตอร์เข้าสู่ไบนารี่เวคเตอร์ pCAMBIA2311 แทนที่ *cp* ยีน ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ NOS terminator แล้วนำเข้า *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่ยาสูบใบใหญ่ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบยาสูบร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกเนื่อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/L, benzyladenine (BA) 1 mg/L cefotaxime 200 mg/L และ geneticin 50 mg/L พบว่าได้ยอดที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ geneticin ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทั้งหมด 47 line คิดเป็นร้อยละ 30 (46/181) และตรวจพบการสอดแทรกของยีน *TSPA11* เข้ากับจีโนมของยาสูบทั้งการตรวจสอบด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction และวิธี Dot blot hybridization ในยาสูบที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกทุก line รวมทั้งตรวจพบการแสดงออกของยีน *TSPA11* โดยวิธี real-time qRT-PCR ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนที่สุ่มเลือกมาในระดับแตกต่างกัน ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยจะนำไปสู่การพัฒนาถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่พืชที่ปลูกเพื่อการค้าชนิดอื่น เพื่อให้พืชนั้นผลิตฟีโรโมนเตือนภัย (*E*)-ß-farnesene ขับไล่เพลี้ยอ่อนที่เป็นแมลงพาหะของไวรัสพืชไม่ให้เข้าใกล้ เพื่อผลในการลดการระบาดของโรคไวรัสในพืชต่อไป

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์