183681

การศึกษาตรวจสอบผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อประสิทธิภาพของการถ่ายชุดยีนที่มียีน *uidA* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ของยาสูบโดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค คือ (1) การใช้ระดับแรงดันก๊าซฮีเลียม 650 และ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (2) ระยะห่างระหว่างแท่นหยุดอนุภาคกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 6 9 และ 12 เซนติเมตร ร่วมกับพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาคบนเนื้อเยื่อเป้าหมายจากจุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเนื้อเยื่อออกไปรอบนอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร และ 3 เซนติเมตร ทำการสุ่มใบยาสูบมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *uidA* กับสารละลาย X-gluc ด้วยวิธี histochemical พบการแสดงออกของยีน *uidA* แบบชั่วคราวภายใต้การควบคุมของ 5'*rrnHv* และ 3' *NtpsbA* แสดงว่าโปรโมเตอร์ *rrn* จาก *Hordeum vulgare* มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของยีนในยาสูบที่แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร มีจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่มีจุดสีน้ำเงินสูงที่สุด (76.27 เปอร์เซ็นต์) และพื้นที่การกระจายตัวของอนุภาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 และ 3 เซนติเมตร มีจำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (2.57 และ 6.11 จุด ตามลำดับ) โดยใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่พบการแสดงออกของยีน *uidA* จากนั้นตรวจสอบและยืนยันการสอดแทรกของชุดยีนเข้าสู่จีโนมคลอโรพลาสต์ในยาสูบที่รอดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot พบว่า ไม่พบชุดยีนสอดแทรกเข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมาย (ตำแหน่งยีน *rbcL* และยีน *accD*) ในจีโนมของคลอโรพลาสต์ยาสูบ

183681

The effect of a number of parameters on chloroplast transformation frequency into tobacco using particle bombardment was investigated. These included (1) the use of rupture disk 650 and 1,100 psi (2) three macrocarrier stopping plate to target distance of 6, 9 and 12 cm. The effective spray area of microprojectile to produce transformants is detailed by the diameter of the inner circle (~1 cm) and outer circle (~3 cm). The tobacco leaves pieces were randomly examined histochemically with X-gluc for testing the expression of *uidA* gene. Transient expression of *uidA* gene in tobacco leave pieces under the control of 5' *rrnHv* and 3' *NtpsbA* regions are obtained. The *rrn* promoter from *Hordeum vulgare* is constitutively transcribed in tobacco. The bombardment using 1,100 psi rupture disk at distance 6 cm, marcrocarrier stopping plate to target, yield the largest number of blue stain precipitate (76.27%). The spray area of microprojectile at the inner and outer circle showed non-significant result in a number of blue spots per piece (2.57 and 6.11 spots, respectively). Simultaneously, wild type, as negative controls, did not show any *uidA* gene expression. Sample of survival tobacco from selected medium were used to determined the integrates of chloroplast expression cassettes into tobacco chloroplast genome using PCR and Southern blot techniques. The results did not display the integration of chloroplast expression cassette genes into target regions (*rbcL* gene and *accD* gene) of chloroplast genomes.