บทคัดย่อ

ได้ถ่ายยีน *myo*-inositol-1-phosphate synthase (*MIPS*) เข้าสู่เซลล์แผ่นใบของยาสูบ และสามารถคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเซลล์ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมให้พัฒนาเป็นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมได้ และได้ชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบม้วนอ่อนของอ้อยปลูกพันธุ์ขอนแก่น 3 และอ้อยป่า ซึ่งใช้สำหรับการทดสอบระบบ CRISPR/Cas9

ได้ออกแบบ target sequence ของยีน *MIPS* จำนวน 4 ตำแหน่ง และได้สอดแทรกแต่ละ target sequence DNA เข้าพลาสมิด pRGEB32 ได้เป็น CRISPR/Cas9-*MIPS* 4 ชนิด จากนั้นได้นำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 เพื่อใช้สำหรับถ่าย CRISPR/Cas9-*MIPS* แต่ละชนิดเข้าสู่แคลลัสยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมและแคลลัสอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และอ้อยป่า พบว่า สามารถถ่าย CRISPR/Cas9-*MIPS* เข้าสู่เซลล์แคลลัสทั้งของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมและอ้อยทั้ง 2 ชนิดได้สำเร็จ และสามารถชักนำให้เซลล์เหล่านั้นพัฒนาเป็นต้นได้ จึงนำไปตรวจสอบการเกิด deletion ของยีน *MIPS* ที่มีอยู่ในจีโนมของพืชทั้ง 3 ชนิดกลับไม่พบการเกิด deletion แต่อย่างใด จึงนำไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีน Cas9 ก็ไม่พบการสังเคราะห์โปรตีนดังกล่าว จึงเป็นไปได้ว่าการไม่เกิด deletion ในจีโนมมีสาเหตุจากการไม่มีการสังเคราะห์ดปรตีน Cas9 นั่นเอง จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความสมบูรณ์ของ CRISPR/Cas9-*MIPS* ว่ามีส่วนใดที่สำคัญขาดหายไปหรือไม่ก่อนนำมาใช้

ABSTRACT

The *myo*-inositol-1-phosphate synthase (*MIPS*) gene was transferred into leaf cells of tobacco and the transgenic tobacco plants were produced. Calli were also induced from the most inner young leave of cultivated sugarcane cv. Khonkan 3 and wild sugarcane. These plant materials were used for testing CRISPR/Cas9 system.

The four target sequences of *MIPS* gene were designed. The target sequence DNA fragments were inserted into pRGEB32 to generate the 4 types of CRISPR/Cas-*MIPS*. The recombinant plasmids were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. These *Agrobacterium* were used for transforming CRISPR/Cas-*MIPS* into transgenic tobacco and sugarcane callus. It was found that CRISPR/Cas-*MIPS* was successfully transformed into

transgenic tobacco cells and the cells of both sugarcane species. The plantlets were regenerated from those cells. The detection of deletion in the *MIPS* gene in the genome of those three transformed plant species was done. It was found that there was no deletion took place in the *MIPS* gene. The determination of Cas9 protein in those transgenic plants revealed that there was no such protein accumulation in the cells. This might be the reason of no deletion in the genome. It is necessary to examine the completion of the CRISPR/Cas9-*MIPS* before using.