บทคัดย่อ

171434

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb.f) และมิสสิงคโปร์ (*Dendrobium* Miss Singapore) เพื่อเลือกสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับกำจัด *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) โดยที่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองชนิดสามารถเจริญเป็นต้นได้ดีและหาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้ทั้งสองชนิด โดยใช้ *A. tumefaciens* และโดยวิธี microprojectile bombardment จากผลการวิจัยพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มมิสสิงคโปร์ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร VW (Vacin and Went, 1949) ดัดแปลงที่เติมไมโออิโนซิทอล 100 มก./ล. ไพริดอกซิน 0.5 มก./ล. ไทเอมิน 0.1 มก./ล. ไกลซิน 2 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 2% (w/v) และผงวุ้น 8 ก./ล. (pH 5.2) ส่วนเอื้องเงินอาหารสังเคราะห์สูตร VW เป็นสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มเช่นกัน โดยเติม benzylamino purine (BAP) 1มก./ล. สามารถชักนำโพรโทคอร์มเอื้องเงินและมิสสิงคโปร์ให้เจริญเป็นต้นในอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลงที่เติมไมโออิโนซิทอล 100 มก./ล. ไพริดอกซิน 0.5 มก./ล. ไทเอมิน 0.1 มก./ล. ไกลซิน 2 มก./ล. น้ำมะพร้าว 15% (v/v) และผงวุ้น 8 ก./ล. (pH 5.2) การทดสอบอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของกล้วยไม้ทั้งสองชนิด พบว่า ไฮโกรมัยซิน (hygromycin) ความเข้มข้น 40 และ 30 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของโพรโทคอร์มเอื้องเงินและมิสสิงคโปร์ได้สมบูรณ์ตามลำดับ ซีโฟแทกซีมความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัด *A. tumefaciens* คือ 200 มก./ล. การส่งถ่ายยีนสู่โพรโทคอร์มเอื้องเงินและมิสสิงคโปร์โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มียีน antisense ACC oxidase ยีนต้านทานไฮโกรมัยซิน (*hpt*) และยีน β-glucuronidase (*gus*) พบว่า สามารถส่งถ่ายยีนสู่โพรโทคอร์มได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อไฮโกรมัยซินเท่ากับ 2.17% และ 8.15% ตามลำดับ ส่วนการส่งถ่ายยีนโดยใช้ microprojectile bombardment โดยใช้พลาสมิดเคลือบบนอนุภาคทองคำขนาด 1 μm และอนุภาคทังสเตนขนาด 1.1 μm แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว พบว่า การส่งถ่ายยีนโดยใช้อนุภาคทองคำมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีนสูงกว่าการใช้อนุภาคทังสเตน ระยะห่างระหว่าง stopping screen กับโพรโทคอร์มเอื้องเงินและมิสสิงคโปร์ที่เหมาะสม คือ 12 และ 9 ซม. ตามลำดับ ซึ่งระยะการยิงดังกล่าวให้จำนวนโพรโทคอร์มที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินและมีการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีนเท่ากับ 15% และ 3.13% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วย GUS assay พบว่า โพรโทคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกของยีน *gus* และเมื่อตรวจสอบการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยีนที่ส่งถ่ายสามารถเข้าไปสอดแทรกในจีโนมของกล้วยไม้ทั้งสองชนิด

ABSTRACT

171434

The objectives of this research were to improve regeneration of *Dendrobium draconis* Rchb.f and *Dendrobium* Miss Singapore, to select the suitable antibiotic for elimination of *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (pCAMBIA1305.1) while maintaining high levels of shoot regeneration and to establish on the optimal conditions for the transformation of both orchid species by using *A. tumefaciens* and microprojectile bombardment technique. The modified VW (Vacin and Went, 1949) medium supplemented with 100 mg/l myo-inositol, 0.5 mg/l pyridoxine, 0.1 mg/l thiamine, 2 mg/l glycine, 2% (w/v) sucrose and 8 g/l agar (pH 5.2) was suitable for protocorm proliferation of *D.* Miss Singapore. The suitable medium for protocorm proliferation of *D. draconis* was VW medium containing 1 mg/l benzylamino purine (BAP). The protocorms of *D. draconis* and *D.* Miss Singapore were successfully regenerated on the modified VW medium supplemented with 100 mg/l myo-inositol, 0.5 mg/l pyridoxine, 0.1 mg/l thiamine, 2 mg/l glycine, 15% (v/v) coconut water and 8 g/l agar (pH 5.2). Hygromycin was tested for its effect on the regeneration of both orchid species. It was found that the protocorms of *D. draconis* and *D.* Miss Singapore were completely inhibited by hygromycin at concentrations of 40 and 30 mg/l, respectively. The optimal concentation of cefotaxime for elimination *A. tumefaciens* strain LBA4404 was 200 mg/l. Transformations of *D. draconis* and *D.* Miss Singapore protocorms were investigated by using *A. tumefaciens* and microprojectile bombardment technique. The plasmid pCAMBIA1305.1 containing antisense ACC oxidase gene, hygromycin resistant (*hpt*) gene and β-glucuronidase (*gus*) gene was used. The percentages of *D. draconis* and *D.* Miss Singapore transformed by *A. tumefaciens* were 2.17% and 8.15%, respectively. Microprojectile bombardment was also used to deliver antisense ACC oxidase gene into the both orchid species. Gold particles (1 μm) and tungsten particles (1.1 μm) were coated with plasmid DNA and introduced into the protocorms of the two orchid species. The result showed that the transformation efficiency of gold particles was higher than that of tungsten particles. The highest transformation percentages of *D. draconis* were 15%, whereas it was 3.13% for *D.* Miss Singapore. The optimal distances from the stopping screen to the target protocorms of *D. draconis* and *D.* Miss Singapore were 12 and 9 cm., respectively. The transformant protocorms and plantlets of *D. draconis* and *D.* Miss Singapore were verified by GUS assay. The GUS assay revealed the GUS activity while PCR method indicated the successful integration of transgenes.