

ไทลิ่ง ศรีก๊กเจริญ 2549: การถ่ายยีน *Flavonoid-3'-hydroxylase* (*f3' h*) และ

Flavonoid-3',5'-hydroxylase (*f3'5' h*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.)

โดยการยิงอนุภาค ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาวิชาพันธุศาสตร์

ภาควิชาพันธุศาสตร์ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D. 119 หน้า

ISBN 974-16-2448-4

Flavonoid-3'-hydroxylase (*F3'H*) และ *Flavonoid-3',5'-hydroxylase* (*F3'5'H*) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างสีดอกในกลุ่มแอนโทไซยานินที่ให้สีน้ำเงินและสีม่วงของดอกไม้ ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการถ่ายยีน *f3' h* และ *f3'5' h* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายแจ็กเกอลีนโทมัส (*D. phalaenopsis* x *D. gouldii*) และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุล (*Dendrobium* Sonia 'Earsakul') เพื่อปรับปรุงสีดอกโดยการตัดต่อยีน *f3' h* และ *f3'5' h* เข้ากับเวกเตอร์พืชที่มีโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้

การถ่ายยีน *f3' h* ในทิศทาง antisense เข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ด้วยการยิงอนุภาคที่เคลือบด้วยพลาสมิด pF3'HPHX2(A) ที่ประกอบด้วยยีนสีดอก *f3' h* ของฤาษีผสม (*Perilla frutescens*) และ ยีนคัดเลือก *hygromycin phosphotransferase* (*hptII*) gene ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S และพลาสมิด pF3'HTG4(A) ที่มียีน *f3' h* ควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยโปรโมเตอร์ Act-1 นำพลาสมิด pF3'HTG4(A) ถ่ายยีนร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ที่มียีนคัดเลือก *hptII* นอกจากนั้นยังถ่ายยีน *f3'5' h* บนพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ที่มียีน *f3'5' h* ของแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) ในทิศทาง sense ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยโปรโมเตอร์ Act-1 ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ภายหลังจากการคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับยีนบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินนาน 14-20 สัปดาห์ พบต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายแจ็กเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแสดงความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจำนวน 29 สายพันธุ์ ต้นกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้ตรวจพบยีนสร้างสีดอก *f3' h* และ *f3'5' h* และยีน *hptII* คิดเป็นร้อยละ 0.32-4.8 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และ Southern blot hybridization

Klairung Srikokcharean 2006: *Dendrobium* Orchid Transformation with the Flavonoid-3'-hydroxylase ($f3'h$) and Flavonoid-3',5'-hydroxylase ($f3'5'h$) genes by Particle Bombardment Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Pattana Srifah Huehne, Ph.D. 119 pages.
ISBN 974-16-2448-4

Flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) and Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) are key enzymes in anthocyanin biosynthetic pathway that influence blue and purple formation of color in flower. Thus genetic transformation of *Dendrobium Jaquelyn Thomas* hybrid (*D. phalaenopsis* x *D. gouldii*) and *Dendrobium sonia* 'Earsakul' with $f3'h$ and/or $f3'5'h$ genes is a strategy to modify flower color. The $f3'h$ and $f3'5'h$ genes were constructed into plant cassette vectors containing suitable promoters for gene expression in orchid.

Antisense $f3'h$ gene was delivered into orchid protocorms by gold particle coated with pF3'HPEXH2(A) containing flower color $f3'h$ gene from *Perilla frutescens* and selectable hygromycin phosphotransferase(*hptII*) gene were driven by CaMV35S promoter and pF3'HTG4(A) consisting of $f3'h$ gene under the control of Act-1 promoter was co-bombarded with pMNK1005 containing selectable *hptII* gene. Furthermore, pF3'5'HTG24(S) containing sense $f3'5'h$ gene from *Catharanthus roseus* driven by Act-1 promoter was also co-bombarded with pMNK1005 to the orchid protocorms. After selection on medium containing hygromycin for 14-20 weeks, 29 lines of the hygromycin-resistance *Dendrobium Jaquelyn Thomas* hybrid and *Dendrobium sonia* 'Earsakul' were obtained. The transgenic plantlets gave positive detection of $f3'h$, $f3'5'h$ and *hptII* gene about 0.32-4.8 percentage by PCR and southern blot hybridization techniques.