

รักษนก โคโต 2549: การถ่ายยีน *CPACO* antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 152 หน้า
ISBN 974-16-2739-4

ได้ศึกษาการถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายสองพันธุ์คือ บอม17 และ เอียสกุล
โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ โดยสร้าง recombination plasmid ของยีน *CPACO* แบบ antisense จาก cDNA
ของยีน *CPACO* ทั้ง 2 ยีนได้แก่ pCAMBIA 1301a*ACO1* และ pCAMBIA 13121a*ACO2* ซึ่งทั้ง 2 พลาสมิดมี
35ScaMV promoter ควบคุมแสดงออกของยีน *ACO* แบบ antisense และมี *hygromycin phosphotransferase*
(*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก และใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ

ในขั้นตอนของการถ่ายยีนได้เตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยใช้ transversely thin cell layers (TCLs) ที่มี
ความหนา 2 มิลลิเมตร นำมา pre-culture นาน 3 วัน ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์
และน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำบาดแผลเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) นาน
6 วินาที แล้วจึงปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
($OD_{600} \approx 1$) นาน 60 นาที แล้วเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม
acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ นาน 2 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อพร้อมคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการ
ถ่ายยีนบนอาหารแข็ง VW ที่เติม hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น
250 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน แล้วคัดเลือกต่อในอาหารคัดเลือกเหลวสูตรเดิมอีก 2 เดือน จากนั้นชักนำ
PLBs ที่เกิดใหม่ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมมันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์
น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกัมมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ จากการถ่ายยีน antisense *CPACO1* พบว่า มี
จำนวนต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนในพันธุ์ บอม17 จำนวน 7 สายต้น และ พันธุ์ เอียสกุล 3 สายต้น
ส่วนการถ่ายยีน antisense *CPACO2* พบว่ามีกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีน 4 สายต้น และ
พันธุ์ เอียสกุล 3 สายต้น

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR พบแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด
800 คู่เบสของยีน *hpt* จากดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ทุกสายต้นที่ตรวจสอบ เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดของ
ยีน *hpt* โดยเทคนิค Southern blot hybridization ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 จำนวน 5 สายต้น พบ
จำนวนชุดของยีนอย่างน้อย 2-4 ชุด การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และการวัดปริมาณเอทิลีนจากใบ
ของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 5 สายต้น พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้นมีกิจกรรมของ
เอนไซม์ ACO และปริมาณเอทิลีนต่ำกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

Rakchanok Koto 2006: Transformation of *CPACO* Antisense into *Dendrobium* Orchid.
Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology,
Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame,
Ph.D. 152 pages.
ISBN 974-16-2739-4

Dendrobium 'Bom17' and *Dendrobium* 'Earsakul' were used for the transformation of *ACO* antisense via *Agrobacterium tumefaciens*. The recombinant plasmids, pCAMBIA 1301a*ACO1* and pCAMBIA 13121a*ACO2* were constructed to contain reverse orientation of *CPACO1* or *CPACO2* cDNA from papaya and *hygromycin phosphotransferase (hpt)* as the plant selectable marker gene under the control of 35SCaMV promoter. Each plasmid was transferred to *A. tumefaciens* strain AGL-1 by electroporation technique.

For the transformation experiment, 2 mm thick of PLBs derived transversely thin cell layers (tTCLs) were sonicated 6 seconds for wounding and were pre-cultured in VW liquid medium supplemented with 15 % coconut water and 1 % sucrose for three days. The tTCLs were then immersed in the suspension of *A. tumefaciens*. (5×10^8 cell/ml, $OD_{600} \approx 1$) in VW liquid medium, for 60 min. For co-cultivation, the tTCLs were transferred onto fresh VW solid medium supplemented with 200 μ M acetosyringone for 2 days. The elimination of *Agrobacterium* and the selection of transformants were performed in two steps, solid and liquid medium. Firstly, the infected tTCLs were selected on VW solid medium supplemented with 30 mg/l hygromycin and 250 mg/l cefotaxime for 1 month and then transferred into VW liquid medium supplemented with the same concentration of both antibiotics for 2 months. For plantlets regeneration, the PLBs derived from survived tTCLs were cultured on VW solid medium supplemented with 15 % homogenated potato 1 % sucrose and 0.2 % activated charcoal. The above procedures yielded 7 putative transformed lines of *Den*. 'Bom17' and 3 putative lines of *Den*. 'Earsakul' when transformed via antisense *CPACO1* construct while in the antisense *CPACO2* construct 4 and 3 putative lines were obtained from these 2 orchid cultivars, respectively.

All of putative transformants were subjected to PCR analysis of *hpt* gene and the result demonstrated the present of 800 bp of *hpt* gene in all transformants. The Southern blot analysis of *hpt* gene revealed the 2-4 copies of *hpt* gene incorporated into the *Dendrobium* genome. ACC oxidase activities and ethylene production measurements were studies on young leave of the transgenic plants and the results indicated that five transgenic lines had lower level of both enzyme activity and ethylene production than that of untransformed line.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

