

รักชนก โคโด 2549: การถ่ายยีน *CPACO antisense* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: 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
จำนวนต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนในพันธุ์ บอม17 จำนวน 7 สายต้น และ พันธุ์ เอียสกุล 3 สายต้น
ส่วนการถ่ายยีน antisense *CPACO2* พบว่ามีกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน 4 สายต้น และ
พันธุ์ เอียสกุล 3 สายต้น

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR พบแถบของจีนส่วนดีเอ็นเอขนาด
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

รักชนก โคโด
ลายมือชื่อนิติกร


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

30 / ต.ค. / 49