221479

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์ 2552: การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์, Ph.D. 140 หน้า

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและยีน *ipt* เป็นยีนคัดเลือก พบว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้น ~ 4.1×10^{17} cfu/ml และการ co-cultivation ระหว่างเชื้อกับ PLBs ของกล้วยไม้ร่วมกับสาร celite ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้เครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีน และใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมภายหลังการถ่ายยีน การศึกษาครั้งนี้ทำการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ คือ ยีน *ACS* และ *ACO* โดยใช้ระบบเวกเตอร์ pMAT21 เพื่อสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเป้าหมายและปราศจากยีนคัดเลือก ในการทดลองครั้งนี้ทำการแบ่งยีน *ACS* และ *ACO* ออกเป็นส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน ได้แก่ บริเวณ 5′ ของยีน, บริเวณ central region และบริเวณ 3′ ของยีน ซึ่งเรียกว่า *ACSA*, *ACSB*, *ACSC* สำหรับยีน *ACS* และ *ACOA*, *ACOB*, *ACOC* สำหรับยีน *ACO* ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุดยีนแต่ละส่วนดังกล่าวในลักษณะ antisense orientation เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ภายหลังการถ่ายยีน 3-4 เดือน PLBs พัฒนาเป็นยอดกระจุกที่เกาะตัวกันแน่น และเกิดการพัฒนาเป็นต้นปกติจากยอดกระจุกดังกล่าวภายหลังการถ่ายยีน 6-8 เดือน หลังจากนั้นนำต้นปกติมาตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot analysis พบว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACSB* และยีน AS-*ACOB* มียีนแทรกตัวอยู่ในจีโนม 1 ชุด จำนวน 5 และ 2 ต้น ตามลำดับ ในขณะที่กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACOA* มียีนแทรกตัวอยู่ในจีโนมตั้งแต่ 2-4 ชุด โดยต้นกล้วยไม้ดังกล่าวทุกต้นปราศจากยีนคัดเลือก จากการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACSB* ได้แก่ line AS-*ACSB*-203A และ AS-*ACSB*-208A มีการแสดงออกของยีน AS-*ACSB* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACS* น้อยลง และในต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACOB* ได้แก่ line AS-*ACOB*-10B และ AS-*ACOB*-11B มีการแสดงออกของยีน AS-*ACOB* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACO* น้อยลง ดังนั้นการถ่ายยีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* ด้วยเวกเตอร์ pMAT21 สามารถสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* และปราศจากยีนคัดเลือกได้

Benjawan Suwannate 2009: Transformation of Ethylene-Related Genes into *Dendrobium* 'Pompadour' Using pMAT21 Vector. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Ms. Orawan Chatchawankanphanich, Ph.D. 140 pages.

Parameters affecting gene transformation into *Dendrobium* 'Pompadour' by pMAT21 vector containing *gus* gene as reporter gene and *ipt* gene as selectable gene were studied. The optimum conditions were used of *Agrobacterium* strain EHA105 at concentration of ~ 4.1 x 10^7 cfu/ml, co-cultivation between *Agrobacterium* and PLBs added with celite 4.5 g/l by vortex mixer for 30 min and use of cefotaxime 200 mg/l for growth suppression of *Agrobacterium* after transformation. In this study, ethylene-related genes which are *ACS* and *ACO* genes were transformed into *Dendrobium* 'Pompadour' by pMAT21 vector to generate marker free transgenic orchid. Both *ACS* and *ACO* genes were divided into 3 regions including 5′ region, central region and 3′ region that was named as *ACSA*, *ACSB*, *ACSC* for *ACS* gene and *ACOA*, *ACOB* and *ACOC* for *ACO* gene, respectively. Each region was cloned into pMAT21 vector in antisense orientation for gene transformation into orchid by *Agrobaterium*. The transformed PLBs developed extreme shooties within 3-4 months after transformation. Then, normal shoot developed from shooties within 6-8 months after transformation. From Southern blot analysis of normal shoots, it showed that five and two putative transgenic orchids transformed with AS-*ACSB* and AS-*ACOB* contained only one copy of transgene, respectively. While, orchids transformed with AS-*ACOA* contained 2-4 copies of transgene. All of these putative transgenic orchids were free of marker gene. From analysis of gene expression at RNA level, two transgenic lines of orchid transformed with AS-*ACSB* which are line AS-*ACSB*-203A and line AS-*ACSB*-208A showed high level of expression of antisense *ACSB*, but expression of endogenous sense *ACS* was low. The results were the same in two transgenic lines of orchid transformed with AS-*ACOB* which are line AS-*ACOB*-10B and line AS-*ACOB*-11B. Therefore, transformation with AS-*ACS* or AS-*ACO* cloned in pMAT21 vector could produce marker-free transgenic orchids containing AS-*ACS* or AS-*ACO* transgenes.