

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์ 2552: การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์อรรณพ ชัชวาลการพาณิชย์, Ph.D. 140 หน้า

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและยีน *ipt* เป็นยีนคัดเลือก พบว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้น $\sim 4.1 \times 10^{17}$ cfu/ml และการ co-cultivation ระหว่างเชื้อกับ PLBs ของกล้วยไม้ร่วมกับสาร celite ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้เครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีน และใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน 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 *ACS4*, *ACSB*, *ACSC* สำหรับยีน *ACS* และ *ACOA*, *ACOB*, *ACOC* สำหรับยีน *ACO* ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุดยีนแต่ละส่วนดังกล่าวในลักษณะ antisense orientation เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ภายหลังการถ่ายยีน 3-4 เดือน PLBs พัฒนาเป็นยอดกระจุกที่เกาะตัวกันแน่น และเกิดการพัฒนาด้านปอดจากยอดกระจุกดังกล่าวภายหลังการถ่ายยีน 6-8 เดือน หลังจากนั้นนำต้นปอดมาตรวจสอบด้วยวิธี 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