

นุชจรี ทัดเศษ 2552: การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 134 หน้า

การชักนำเนื้อเยื่อปลายยอดของพรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* 2 ชนิดคือ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' ให้เกิดยอดหลายยอด (multiple shoots) เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน ทำได้โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA โดย *C. affinis* ใช้ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน *C. wendtii* 'Brown' ใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปลายยอดของ *C. affinis* และ *C. wendtii* 'Brown' โดยใช้ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCambia1304 ซึ่งมียีน β -glucuronidase (*gus*) และยีน green fluorescent protein (*mgfp5*) เป็นยีนรายงานผลและยีน hygromycin phosphotransferase (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน คือ การใช้เนื้อเยื่อปลายยอดยาว 5 มิลลิเมตร ทำบาดแผลที่เนื้อเยื่อโดยการผ่าครึ่งตามยาวแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 5 วินาทีในการถ่ายยีนเข้าสู่ *C. affinis* ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ส่วน *C. wendtii* 'Brown' ใช้สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ และกระตุ้นเชื้อในช่วงของการปลูกเชื้อและการเลี้ยงร่วมโดยใช้ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และใช้เวลาในการปลูกเชื้อนาน 2 ชั่วโมง และการเลี้ยงร่วมนาน 3 วัน จากนั้นนำยอดมากำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* และคัดเลือกบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากตามที่กล่าวแล้ว และเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดที่เจริญได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ พบว่ามียอด ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนของ *C. affinis* เกิดขึ้นจำนวน 35 ยอด และ *C. wendtii* 'Brown' จำนวน 6 ยอด ซึ่งเมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus mgfp5* และ *hpt* ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามียีนอยู่แตกต่างกันในแต่ละสายยอด แสดงว่าการถ่ายยีนครั้งนี้ได้ต้นที่มีลักษณะเป็น chimera และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp5* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo (excitation 488 nm และ emission 510 nm) พบว่ายอดของ *C. affinis* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนมีการเรืองแสงสีแดงและสีเหลือง แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียว

Nootjaree Tudsas 2009: The Transformation of *Green Fluorescent Protein* Gene into *Cryptocoryne* spp. via *Agrobacterium tumefaciens*. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 134 pages.

The multiple shoots of 2 *Cryptocoryne* species, *C. affinis* and *C. wendtii* 'Brown' were induced from apical shoot explants for using as plant material for genetic transformation. The shoot explants were cultured for 5 days in MS liquid medium supplemented with 0.01 mg/l TDZ and 0.3 mg/l BA then transferred onto MS solid medium for 4 weeks in which, for *C. affinis*, 4 mg/l BA was added and for *C. wendtii* 'Brown', 1 mg/l BA was added. Thereafter, the procedures of gene transformation in *C. affinis* and *C. wendtii* 'Brown' using *Agrobacterium tumefaciens* were optimized. Two strains of *A. tumefaciens* harboured the pCAMBIA1304 which contained β -glucuronidase (*gus*) and green fluorescent protein (*mgfp5*) genes as reporter genes and hygromycin phosphotransferase (*hpt*) gene as a plant selectable marker gene were compared. The 5 mm long *in vitro* shoots wounded by cut in half lengthwise followed by 5 sec sonication were suitable the target tissues. The suitable strain of bacterial for *C. affinis* transformation was *A. tumefaciens* strain EHA105 and for *C. wendtii* 'Brown' was the strain AGL-1. *Agrobacterium* was also activated by 100 μ M acetosyringone during inoculation and co-cultivation steps. The optimal period for inoculation was 2 hr and for co-cultivation was 3 days. The bacteria was then eliminated from the explants followed by selected on multiple shoots induction media stated above and supplemented with 5-10 mg/l hygromycin and 300 mg/l cefotaxime for 6 weeks. The survived shoots were then cultured on the same medium but without any antibiotic. The number of 35 putative transformed shoots of *C. affinis* and 6 of *C. wendtii* 'Brown' were recovered. After subjected to PCR analysis of *gus*, *mgfp5* and *hpt* genes, the result revealed the difference in the presence of the transgenes in putative transformants which confirmed that the putative transformed shoots were chimeras. Latter, the putative transformed shoots were investigated for the expression of *mgfp5* gene using stereo microscope (excitation at 480 nm and emission at 510 nm) and only red and yellow fluorescence were observed but not the green fluorescence.