

นุชจรี ทัดเศษ 2552: การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสริมศิริ จันทรเปรม, 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 จากนั้นนำยอดมาทำจัดเชื้อ *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