

วัตถุประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้คือการศึกษากิจกรรมของโคลิซินที่มีความเข้มข้นของโคลิซินที่มีผลต่อระดับพลอยดีในกล้วยไม้และการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่กล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* และวิธี particle bombardment เมื่อนำเมล็ดกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (1949) ตัดแปลงที่เติม myo-inositol 100 มก./ล., thiamine 1 มก./ล., nicotinic acid 1 มก./ล., pyridoxine 1 มก./ล. และ glycine 4 มก./ล. น้ำมะพร้าว 15% วัน 8 ก./ล. และน้ำตาลซูโครส 2% pH 5.4 เมล็ดสามารถงอกได้ 98% และสามารถเพิ่มปริมาณโพรโทคอร์มเอื้องแปรงสีฟันโดยการย้ายลงในอาหารสูตรเดิม ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยดีในกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน เชื้อโพรโทคอร์มด้วยสารละลายโคลิซินความเข้มข้น 0.05 % เป็นเวลา 1 วัน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เอื้องแปรงสีฟันเกิดโพลีพลอยดีและมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด การแช่ด้วยสารละลายโคลิซินความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลาในการแช่นานขึ้นจะทำให้อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนลดลง ปริมาณคลอโรฟิลล์ลักษณะของปากใบและโฟลไซเมตรี ได้นำมาใช้ในการวัดระดับพลอยดีของพืช จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของโพรโทคอร์มเอื้องแปรงสีฟันพบว่า สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 25 มก./ล. มีประสิทธิภาพในการใช้คัดเลือกพืชแปลงพันธุ์ ความเข้มข้นสูงสุดของซีพีแทกซีมที่โพรโทคอร์มเอื้องแปรงสีฟันสามารถเจริญได้ คือ 500 มก./ล. การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่มียีน antisense ACC oxidase, ยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hptII*) เป็นยีนเครื่องหมาย และ *gus* gene เป็นยีนรายงานผล พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโพรโทคอร์มเอื้องแปรงสีฟันร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* คือ 40 นาที ส่วนการส่งถ่ายยีนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันคือ ใช้แรงดันของก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 1,100 ปอนด์/ตร.นิ้ว โดยมีระยะห่างระหว่าง stopping screen กับโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันเท่ากับ 6 ซม. ความสำเร็จของการส่งถ่ายยีนได้ตรวจสอบจาก GUS assay และการสอดแทรกของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) พบว่า มีการสอดแทรกของยีน antisense ACC oxidase, 35s และ NOS ในกล้วยไม้ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน

The objectives of this research were to investigate the effect of colchicine concentrations on the ploidy level of orchid species and the efficiency of transformation of *Dendrobium secundum* by using *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. The suitable medium which resulted in 98% for seed germination was the Vacin & Went (1949) medium supplemented with 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l thiamine, 1 mg/l nicotinic acid, 1 mg/l pyridoxine and 4 mg/l glycine, 15% coconut water and 0.8% agar at pH 5.4 under light condition. Protocorms with high proliferation capacity were cultured on the modified VW medium supplemented with 0.5 mg/l NAA. For polyploid induction in *D. secundum*; protocorms treated with 0.05% colchicine for 1 day gave the highest frequencies of polyploidy in regenerated plants and the maximum surviving rate. Higher concentration of colchicine and longer duration of treating time reduced survival of explants. Chlorophyll content, stomata characteristics and flow cytometry were used for the confirmation of ploidy levels. An experiment was conducted to determine the effect of antibiotic on protocorm growth. It was found that hygromycin at 25 mg/l was effective for the selection of transformants. The maximum concentration of cefotaxime that protocorms could tolerate was 500 mg/l. The genetic transformation of *D. secundum* was mediated by *A. tumefaciens* strain LBA 4404, which harbored the plasmid pCAMBIA 1305.1 containing antisense ACC oxidase gene, *hpt II* gene as a selectable marker and *gus* gene as a reporter gene. The optimal co-cultivation time was 40 minutes. The particle bombardment was also used to transform *D. secundum* with antisense ACC oxidase, *gus* and *hptII* genes. Using Gus assay to test transformation efficiency under the proper conditions, we found that particle bombardment with 1,100 pound/inch² helium at the distance of 6 cm from stopping screen to protocorms resulted in the highest transformation efficiency. The successful transformation was confirmed by histochemical GUS assay and PCR analysis. The GUS assay revealed the GUS activity, while the PCR indicated the integration of antisense ACC oxidase gene, 35s promoter and NOS terminator in the transgenic orchids.