ชื่อเรื่อง	: **การส่งถ่ายยีนเข้าพืชปทุมมา** (Curcuma alismatifolia Gagnep) **โดยใช้** Agrobacterium tumefaciens
ผู้วิจัย	: **นายภพเก้า พุทธรักษ์**
ประธานที่ปรึกษา	: รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑล สงวนเสริมศรี
กรรมการที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คงศักดิ์ พร้อมเทพ
	: รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย
ประเภทสารนิพนธ์	: วิทยานิพนธ์ วท.ด. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2549

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) จากกลีบดอกเทียม (petal) ของช่อดอกปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) โดยเทคนิค RT-PCR จากการวิเคราะห์ด้วยอิเลคโตรโฟเรซีสสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 2 ชิ้น (fragment) คือ ชิ้นส่วน (fragment) ที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบสและ 850 คู่เบสและเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทั้งสองมาเปรียบเทียบกันพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองเป็นยีน *DFR* ที่ต่างกัน หลังจากหาลำดับ นิวคลีโอไทด์และนำมาเปรียบเทียบข้อมูลใน Genbank พบว่า fragment ที่มีขนาด 500 คู่เบส มีความคล้ายคลึงกับยีน *DFR* ของ *Lilium speciosum* โดยมีค่า Amino acid identity 65 เปอร์เซ็นต์ และ Nucleic acid identity เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ fragment ที่มีขนาด 850 คู่เบส มีความคล้ายคลึงกับยีน *DFR* ของ *Anthurium andraeanum* โดยมีค่า amino acid identity 96 เปอร์เซ็นต์ และ nucleic acid identity 98 เปอร์เซ็นต์

ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่พืชนั้น *GUS* gene ถูกส่งถ่ายเข้าสู่ช่อดอกย่อย (coinfloresence) ของปทุมมา เนื้อเยื่อพิทูเนีย และยาสูบ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด ตามลำดับดังนี้ คือ pSCV1.6 , pBI121 , pCAMBIA1303 และ pCAMBIA1304 หลังจากนั้นตรวจสอบผลการส่งถ่าย*GUS* gene โดยเทคนิค GUS Histochemical Assay และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยทำการวัดผลช่อดอกย่อยของปทุมมาหลังการส่งถ่ายยีน 7 เดือน ส่วนเนื้อเยื่อพิทูเนียและยาสูบวัดผลหลังการส่งถ่ายยีน 3 เดือน ผลปรากฏว่าต้นปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นต้นได้ ส่วนพิทูเนียและยาสูบนั้นสามารถเจริญเป็นต้นได้ทั้ง pSCV1.6 และ pBI121 โดยประสิทธิภาพการส่งถ่ายของปทุมมาเมื่อตรวจสอบโดยวัดการแสดงออกของ *GUS* gene คือ 0.83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพิทูเนียและยาสูบที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 คือ 23 เปอร์เซ็นต์ และ 21 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ

พิทูเนียและยาสูบที่ส่งถ่ายด้วย pBI121 มีประสิทธิภาพ คือ 13 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช 3 ชนิด คือ retarded shoot ของปทุมมา ใบพิทูเนีย และยาสูบ โดย pBI121 ตรวจสอบผลการส่งถ่าย *GUS* gene โดยเทคนิค GUS Histochemical Assay และ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หลังการส่งถ่ายยีน 5 เดือน นำปทุมมาที่สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก มาตรวจสอบโดยวัดการแสดงออกของ *GUS* gene พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน คือ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำพิทูเนีย และยาสูบหลังการส่งถ่ายยีน 3 เดือน ที่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบการทำงานของ *GUS* gene พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน 25 เปอร์เซ็นต์ และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของ *GUS* gene และ 35S promotor ทุกต้น

Title	: GENETIC TRANSFORMATION IN PATUMMA (Curcuma alismatifolia Gagnep.) VIA Agrobacterium tumefaciens
Author	: Mr. Phopgao Buddharak
Major Adviser	: Assoc. Prof. Dr.Mondhol Sanguansermsri
Adviser	: Assist. Prof Dr.Kongsak Promthep
	: Assoc. Prof. Dr.Somboon Anuntalabhochai
Type of Degree	: Doctor of Philosophy Degree in Biological Science (Ph.D. in Biological Science), Naresuan University, 2006

Abstract

In this study, *DFR* gene was isolated from petal of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using RT-PCR technique. Electrophoresis analyses revealed that 2 *DFR* genes were isolated at 500 bp and 850 bp. After sequencing and comparison to Genbank database , the 500 bp fragment showed high identity to *DFR* gene from *Lilium speciosum* at 65 and 96 percent of Amino acid and Nucleic acid respectively. Whereas the 850 bp fragment similar to *DFR* gene from *Anthurium andraeanum*. Amino acid identity was 96 percent and nucleic acid identity was 98 percent.

In part of transformation, *Agrobacterium tumefaciens* strain AGLO harboring the binary vector pSCV1.6, pBI121, pCAMBIA1303 and pCAMBIA1304 carrying the *uidA* gene encoding GUS activity were chosen to transform into plant tissues of *C. alismatifolia* Gagnep., *Petunia axillaris* and *Nicotiana tabacum*. The transgenic plants were analyzed by detection of histochemical b-glucuronidase (GUS) activity and Polymerase Chain Reaction (PCR). The explants of transformation, *C. alismatifolia* Gagnep at 7 months, *P. axillaris* and *N. tabacum* at 3 months were detected for GUS expression. In case of *C. alismatifolia* Gagnep., only pSCV1.6 was detected in *Curcuma* 's tissues and regenerated on selective media. While, both pSCV1.6 and pBI121 were found in tissues of *P. axillaris* and *N. tabacum*. The efficiency of transformation by GUS expression detection was 0.83 percent for the *Curcuma* shoots. The explants of *P. axillaris* and *N. tabacum* were transformed with pSCV1.6 and showed GUS positive at 23 percent and 21 percent

respectively. Whereas, the explants of *P. axillaris* and *N. tabacum* present in 13 percent and 5 percent respectively when transformed with pBI121.

The *DFR* gene (850bp) was constructed in pBI121 and transformed into retarded shoot of *C. alismatifolia* Gagnep., *P. axillaris* and *N. tabacum* by *A. tumefaciens* strain AGLO. Transgenic plants were analyzed by GUS assay and Polymerase Chain Reaction (PCR). After 5 months in tissue culture, the shoots on selective media were detected and the efficiency of transformation was 5 percent. Furthermore, the explants of *P. axillaris* and *N. tabacum* were transformed by the pBI121 harbouring *DFR* gene and transgenic plants were analyzed after 3 months. The efficiency was 25 and 23 percents of GUS assay respectively. Moreover PCR technique reveal the positive bands of *GUS* gene and 35S promoter.