

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของ 2, 4-D และน้ำตาลต่อการเพิ่มน้ำหนักและขนาดของแคลลัสอ้อย

พันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์ K 92-80

นำไปอ่อนชั้นในสุดที่ยังมีวุ้นอยู่ของอ้อย มาลอกกาบใบออก ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกและล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้งๆละ 10 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70 % (v/v) 3 - 5 นาที ย้ายใบอ่อนไปแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10% ที่เติม tween 20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตัดใบอ่อนขนาด 0.5 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D 3 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และผงวุ้น 8 ก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากนั้นนำแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์ K 92-80 อายุ 3 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีฮอร์โมน 2, 4-D ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 มก./ล. น้ำตาลปริมาณ 0, 10, 15 และ 30 ก./ล. อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.6-5.7 นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

ตารางที่ 1 อาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D และ น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ

อาหารสูตร	ความเข้มข้น 2, 4-D (มก./ล.)	ความเข้มข้นน้ำตาล (ก./ล.)
1	3	10
2	3	15
3	3	30
4	4	10
5	4	15
6	4	30
7	5	10
8	5	15
9	5	30

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดต้นในอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และอ้อยพันธุ์ K 92-80

นำแคลลัสอ้อยพันธุ์ K 92-80 และพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส อายุ 3 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน 2 ชนิดร่วมกันคือ BA และ NAA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ BA 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. NAA 0, 0.5 และ 1 มก./ล. น้ำตาลซูโคส 30 ก./ล. และผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.6 - 5.7 นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

ตารางที่ 2 อาหารสูตร MS ที่มี BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

อาหารสูตร	ความเข้มข้น BA (มก./ล.)	ความเข้มข้น NAA (มก./ล.)
1	0	0
2	0.5	1
3	1	1
4	2	1
5	3	1
6	4	1
7	0.5	0.5
8	1	0.5
9	2	0.5
10	3	0.5
11	4	0.5



การทดลองที่ 3 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย
พันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80

นำแคลลัสของอ้อยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล. และอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นอ่อน ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500 และ 600 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลโดยสังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย ร้อยละการรอดชีวิตของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

การทดลองที่ 4 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อน
อ้อยพันธุ์ มิตรผล 99-94 และ K 92-80

นำแคลลัสของอ้อยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 15, 25 และ 50 มก./ล. และอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นอ่อน ที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลโดยสังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อน เปรียบเทียบการรอดชีวิตของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

การทดลองที่ 5 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404
(pCAMBIA 1305.1)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มก./ล. บ่มบนเครื่องเขย่าชนิด reciprocal shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ นำอาหารเหลวมาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 และ 36 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้ไปเขียนกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อนำค่าที่ได้ไปศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อไป

การทดลองที่ 6 ผลของซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว LB ที่เติมกานามัยซิน 100 มก./ล. และเติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 และ 175 มก./ล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* โดยนำอาหารเหลวมาวัดค่า OD₆₀₀ เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อ จากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้มาเขียนบนอาหารแข็ง LB เพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญโดยสังเกตว่าเชื้อมีการเจริญบนอาหารแข็ง LB หรือไม่

การทดลองที่ 7 การส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80

7.1 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์

LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่มียีน *chitinase* ในอาหารเหลว LB ที่เติมกานามัยซิน 100 มก./ล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C วัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 - 1.5 ใสเชื้อ 1 มล. ลงในอาหารเหลว MS (pH 5.8) ที่มีกานามัยซิน 100 มก./ล. เขย่าบนเครื่องเขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นบ่มแคลลัสอ้อยที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ร่วมกับ *A. tumefaciens* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS โดยบ่มที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที นำแคลลัสอ้อยมาซบเชื้อ *A. tumefaciens* ออกด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 2 วัน ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C จากนั้นกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* โดยการล้างแคลลัสอ้อยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ซีโฟแทกซิม 500 มก./ล. เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มีไฮโกรมัยซิน 25 มก./ล. และซีโฟแทกซิม 200 มก./ล. ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS assay

7.2 การศึกษาผลของ acetosyringone (AS) ต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล

99-94 และพันธุ์ K 92-80 โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่มียีน *chitinase* ในอาหารเหลว LB ที่เติมกานามัยซิน 100 มก./ล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C วัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 - 1.5 ใสเชื้อ 1 มล. ลงใน

อาหารเหลว MS (pH 5.8) ที่มีกานามัยซิน 100 มก./ล. เขย่าบนเครื่องเขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้น บ่มแคลลัสอ้อยที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ร่วมกับ *A. tumefaciens* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม และไม่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM บ่มที่เวลาที่เหมาะสมของอ้อยแต่ละพันธุ์ นำแคลลัสอ้อยมาซบเชื้อ *A. tumefaciens* ออกด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 2 วัน ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25\pm 2^\circ\text{C}$ จากนั้นกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* โดยการล้างแคลลัสอ้อยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ซีโฟแทกซิม 500 มก./ล. เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มีไฮโกรมัยซิน 25 มก./ล. และซีโฟแทกซิม 200 มก./ล. ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25\pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS assay

การทดลองที่ 8 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนและไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN) นำดีเอ็นเอที่สกัดข้างต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบการสอดแทรกของยีน สำหรับ primer ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้มีลำดับเบสคือ

35S	มีลำดับเบสคือ 5' GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3'
Anti -35S	มีลำดับเบสคือ 5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'
NOS	มีลำดับเบสคือ 5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'
Anti -NOS	มีลำดับเบสคือ 5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'

การเตรียม reaction volume ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μl ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละหลอด

สารละลาย	ปริมาตรต่อreaction (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer	2.5	1X
25 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTPs	2.5	0.32 mM
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	5.8	-
Primer 1 (5pmol/μl)	5	1 pmol
Primer 2 (5pmol/μl)	5	1 pmol
Tag DNA polymerase (5unit/μl)	0.2	1 unit
DNA solution (200ng/μl)	2.5	20 ng/l
Total	25	

หลังจากนั้นนำหลอด mixer ที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มชิ้นส่วน DNA โดยตั้งอุณหภูมิรอบดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 predenaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อยดังนี้

Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที

Annealing อุณหภูมิ 55 °C สำหรับ primer 35S และ NOS เป็นเวลา 40 วินาที

Extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 final extension อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที

ในขั้นตอนที่ 1 และ 3 ทำซ้ำ 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 ทำซ้ำ 40 รอบ หลังจากนั้นตรวจดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 1.5%

