ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
203374

การส่งถ่ายยีนสู่อ้อย(*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

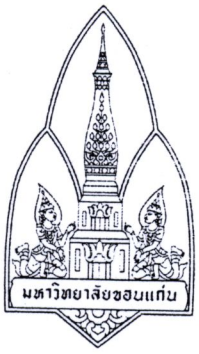
TRANSFORMATION OF SUGARCA (*Saccharum officinarum* L.) MEDIATED BY *Agrobacterium tumefactens*

นางสาวอนาภาภร พูลโหย็กสาย

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2553

b00259240

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
203374



การส่งถ่ายยีนสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

TRANSFORMATION OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens*

นางสาวอาภากร พูลโพธิ์กลาง

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2553

การส่งถ่ายยีนสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

นางสาวอาภากร พูลโพธิ์กลาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2553

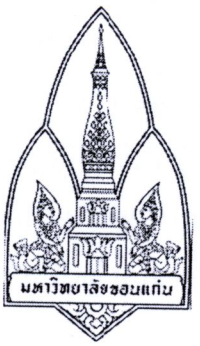
TRANSFORMATION OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens*

MISS APAKORN POONPOKLANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY

2010



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

หลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ชื่อวิทยานิพนธ์: การส่งถ่ายยีนสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาวอาภากร พูลโพธิ์กลาง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ดร. อนวัช สุวรรณกุล	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค	กรรมการ
รศ. ดร. อรุณรัตน์ ฉวีราช	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค)

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ลำปาง แม่นมาตย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....

(ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.เกียรติ แสงอรุณ)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

อาภากร พูลโพธิ์กลาง. 2553. **การส่งถ่ายยีนสู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens***. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค

บทคัดย่อ

203374

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การส่งถ่ายยีน *chitinase* เข้าสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 โดยใช้ *A. tumefaciens* เมื่อนำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D 4 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 15 มก./ล. และสูตรอาหาร MS ที่มี 2,4-D 4 มก./ล. ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 มก./ล. สามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80 ได้ดีที่สุดตามลำดับ เมื่อศึกษาสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดต้น พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ให้เกิดต้นได้สูงสุด 15 ต้น และสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 ให้เกิดต้นได้สูงสุด 25 ต้น การศึกษาเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะสำหรับกำจัด *A. tumefaciens* โดยที่แคลลัสอ้อยสามารถเจริญเติบโตได้ในระดับสูง และหาสภาวะที่เหมาะสมของการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์ K92-80 โดยใช้ *A. tumefaciens* จากผลการวิจัยพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของซีโฟแทกซีมที่แคลลัสและต้นอ่อนอ้อยทนได้ คือ 400 และ200 มก./ล. ตามลำดับ ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยได้ คือ 50 และ 30 มก./ล. ตามลำดับ เมื่อทำการส่งถ่ายยีน *chitinase* สู่แคลลัสอ้อย โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ที่มี *chitinase* gene *hpt* gene เป็นยีนเครื่องหมาย *gus* gene เป็นยีนรายงานผล พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* คือ 20 และ40 นาที ตามลำดับโดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ gus เท่ากับ 80 และ100 % ความสำเร็จของการส่งถ่ายยีนได้ตรวจสอบจาก GUS assay และการสอดแทรกของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) พบว่ามีการสอดแทรกของยีน *35S* และ *NOS* ในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

Apakorn Poonpoklang. 2010. **Transformation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens***. Master of Science Thesis in Biology. Graduate School, Khon Kean University.

Thesis advisor: Assoc. Prof. Dr. Sumontip Bunnag

ABSTRACT

203374

The objective of this study was to transfer *chitinase* gene into sugarcanes cv. Mitrphol 99-94 and K 92-80 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*the. The calli were cultured on the modified MS medium supplemented with various concentration of 2,4-D and sucrose. The suitable media for callus proliferation of sugarcanes cv. Mitrphol 99-94 and K 92-80 were MS media with 4 mg/L 2,4-D and combination with 15 g/L sucrose and 30 g/L sucrose, respectively. Experiment was performed to determine the effect of plant growth regulators on the number of shoots per callus. It was found that the highest shoot numbers of Mitrphol 99-94 were 15 shoots per callus when cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA, while the highest number of shoot per callus of K 92-80 was successfully regenerated on MS medium enriched with 1 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA. The number of shoots were 25 shoots per callus. The suitable cefotaxime for elimination of *A. tumefaciens* while maintaining high levels of callus proliferation of sugarcanes cv. Mitrphol 99-94 and K 92-80 were 400 and 300 mg/l, respectively. The calli and plantlets of sugarcane of Mitrphol 99-94 and K 92-80 were completely inhibited by hygromycin concerntation at 50 and 30 mg/l, respectively. Transformation of sugarcane cv. Mitrphol 99-94 and K 92-80 were investigated by using *A. tumefaciens*. The plasmid pCAMBIA 1305.1 containing *chitinase* gene, *hpt* gene (selectable marker) and *gus* gene (reporter gene) was used. The optimal co-cultivation time for sugarcane sugarcanes cv. Mitrphol 99-94 and K 92-80 were 20 and 40 minutes, respectively. The highest transformation percentage of sugarcane cv. Mitrphol 99-94 was 80%, whereas it was 100% for K 92-80. The successful transformation was confirmed by histochemical GUS assay and PCR analysis. PCR analysis comfirmed gene integration by detection of *35S* and *NOS*.

ส่วนดีของงานวิจัยนี้มอบให้บุพการีและคณาจารย์

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความเรียบร้อย โดยได้รับความช่วยเหลือแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. สุมนทิพย์ บุนนาค ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณรัตน์ ฉวีราช และ ดร. อนวัช สุวรรณกุล กรรมการ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำ และคำปรึกษา ชี้แนวทางอันมีประโยชน์ทั้งในการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง สนับสนุนให้กำลังใจและเป็นแบบอย่างที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อบรมให้ความรู้ และแนะนำแนวทางการเรียนรู้ต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณศูนย์อนุกรมวิธานประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณทินกร ซีประเสริฐ คุณกุลธิดา ดวงศรี คุณศิรินภา พงษ์พีระ รวมถึงพี่ๆ น้องๆ และบุคลากรภาควิชาชีววิทยา ที่มิได้เอ่ยนามที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาจนสามารถบรรลุเป้าหมายที่ตั้งใจได้สำเร็จ

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

อาภากร พูลโพธิ์กลาง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
คำอุทิศ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
3. ขอบเขตของการวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	3
2. ลักษณะประจำพันธุ์ของอ้อยที่ใช้ในการศึกษา	4
3. โรคอ้อย	5
4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย	5
5. ไคติน (Chitin)	7
6. ไคติเนส (Chitinase)	8
7. การส่งถ่ายยีนสู่พืช (Plant gene transfer)	8
8. Acetosyringone	13
9. การส่งถ่ายยีนสู่อ้อยโดยใช้ *Agrobacterium*	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
การทดลองที่ 1 ผลของ 2, 4-D และน้ำตาลต่อการเพิ่มน้ำหนักและขนาดของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์ K 92-80	15

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
การทดลองที่ 2	ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดต้นในอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และอ้อยพันธุ์ K 92-80	16
การทดลองที่ 3	อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80	17
การทดลองที่ 4	อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ มิตรผล 99-94 และ K 92-80	17
การทดลองที่ 5	ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)	17
การทดลองที่ 6	ผลของซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens*	18
การทดลองที่ 7	การส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80	18
การทดลองที่ 8	การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย		22
ผลการทดลองที่ 1	ผลของ 2, 4-D และน้ำตาลต่อการเพิ่มน้ำหนักและขนาดของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์ K 92-80	22
ผลการทดลองที่ 2	ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดต้นในอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และอ้อยพันธุ์ K 92-80	29
ผลการทดลองที่ 3	อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80	38
ผลการทดลองที่ 4	อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ มิตรผล 99-94 และ K 92-80	42
ผลการทดลองที่ 5	ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)	47
ผลการทดลองที่ 6	ผลของซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens*	48
ผลการทดลองที่ 7	การส่งถ่ายยีนสู่อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80	50
ผลการทดลองที่ 8	การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	55
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	69
ประวัติผู้เขียน	81

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	อาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D และ น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ	15
ตารางที่ 2	อาหารสูตร MS ที่มี BA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	16
ตารางที่ 3	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละหลอด	20
ตารางที่ 4	ระดับการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ที่บ่มร่วมกับเชื้อ *A. tumtfaciens* เป็นเวลา 0, 20, 40 และ 60 นาที	51
ตารางที่ 5	น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสและขนาดเฉลี่ยของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และน้ำตาลซูโครส ระดับต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	71
ตารางที่ 6	น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสและขนาดเฉลี่ยของแคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารแข็งสูตรMS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และน้ำตาล ซูโครสระดับต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	72
ตารางที่ 7	จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส จำนวนรากเฉลี่ยต่อแคลลัส เปอร์เซ็นการเกิดต้น ต่อแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากต่อแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	73
ตารางที่ 8	จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส จำนวนรากเฉลี่ยต่อแคลลัส เปอร์เซ็นการเกิดต้น ต่อแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากต่อแคลลัสของอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	74
ตารางที่ 9	ความยาวต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวรากเฉลี่ยต่อแคลลัสของอ้อย พันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสูตร อาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	75
ตารางที่ 10	สารละลายต้นตอของอาหารสังเคราะห์สูตร Musashige and Skoog's (MS)	77

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงส่วนประกอบของปล้อง (ก) และกาบใบของอ้อย (ข)	4
ภาพที่ 2	โครงสร้างทางเคมีของไคติน	8
ภาพที่ 3	แสดงการเกิดปุ่มปมในต้นมะเขือเทศ	10
ภาพที่ 4	Ti plasmid	10
ภาพที่ 5	กลไกการส่งถ่ายยีนสู่พืชโดย *Agrobacterium tumefaciens*	11
ภาพที่ 6	แผนที่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ขนาด 11846 bp ที่มีโปรโมเตอร์ คือ CaMV35S promoter ยีนเครื่องหมายคือ *nptII* gene ต้านทานต่อกานามัยซิน และ *hpt* gene ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน	21
ภาพที่ 7	แสดงส่วนพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มียีน *chitinase*	21
ภาพที่ 8	น้ำหนักสดของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่แปรผัน 2, 4-D และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	23
ภาพที่ 9	ขนาดเฉลี่ยของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์	24
ภาพที่ 10	ลักษณะการเจริญของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่แปรผัน 2, 4-D และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	25
ภาพที่ 11	น้ำหนักสดของแคลลัสอ้อยพันธุ์ K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่แปรผัน 2, 4- D และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	26
ภาพที่ 12	ขนาดเฉลี่ยของแคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่แปรผัน 2, 4-D และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์	27
ภาพที่ 13	ลักษณะการเจริญของแคลลัสอ้อยพันธุ์ K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 14	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นจากแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	30
ภาพที่ 15	เปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	31
ภาพที่ 16	จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	32
ภาพที่ 17	จำนวนรากเฉลี่ยต่อแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	33
ภาพที่ 18	ความยาวต้นเฉลี่ยของแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	34
ภาพที่ 19	ความยาวรากเฉลี่ยของแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และพันธุ์K 92-80 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	35
ภาพที่ 20	ลักษณะการเกิดยอดจากแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	36
ภาพที่ 21	ลักษณะการเกิดยอดจากแคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	37
ภาพที่ 22	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสพันธุ์ K92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมซีโฟแทกซิม ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 23 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์ K92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีม ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 39

ภาพที่ 24 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 39

ภาพที่ 25 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 39

ภาพที่ 26 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีม ความ เข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 40

ภาพที่ 27 ลักษณะของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 41

ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 41

ภาพที่ 29 ลักษณะของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 42

ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 43

ภาพที่ 31 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์ K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 44

ภาพที่ 32 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 44

ภาพที่ 33 ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 45

ภาพที่ 34 เปอร์เซ็นการรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความ เข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 45

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 35	ลักษณะของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ K 92-80 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์	46
ภาพที่ 36	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	46
ภาพที่ 37	ลักษณะของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	47
ภาพที่ 38	การเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ	48
ภาพที่ 39	ผลการวัดค่า OD_{600} เปรียบเทียบระดับการเจริญของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1)ในอาหารเหลว LBที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ	49
ภาพที่ 40	การเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) บนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่างๆ	49
ภาพที่ 41	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ที่เกิดจากการบ่มแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที	50
ภาพที่ 42	ลักษณะของแคลลัสพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ที่บ่มร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที	51
ภาพที่ 43	เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* ของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และK 92-80 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่เติมและไม่เติม acetosyringone (AS)	52
ภาพที่ 44	ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่เติม acetosyringone (ก) และไม่เติม acetosyringone (ข)	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 45	ลักษณะของแคลลัสอ้อยพันธุ์K 92-80 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) ที่เติม acetosyringone (ก) และไม่เติม acetosyringone (ข)	53
ภาพที่ 46	ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 35S คู่กับ anti-35S	54
ภาพที่ 47	ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer NOS คู่กับ anti-NOS	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ก./ล.	กรัมต่อลิตร
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
มก./ล.	มิลลิกรัมต่อลิตร
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
^{0}C	องศาเซลเซียส
$mol/m^{-2}s^{-1}$	ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที
µl	ไมโครลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
nm	นาโนเมตร
2, 4-D	2, 4-dichlorophenoxy acetic acid
BA	6-benzylaminopurine
NAA	naphthalene acetic acid
OD	optical density
X-gluc	X-glucuronide