บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การส่งถ่ายยีน chitinase สู่อ้อยพันธุ์ Phil 66-07 และพันธุ์ มิตรผล 99-94 โดยนำใบอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA, yeast extract และน้ำมะพร้าว ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า อาหาร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15% (โดยปริมาตร) สามารถชักนำใบอ่อนอ้อยให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. สามารถกระตุ้นให้แคลลัสเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด เมื่อนำแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. สามารถกระตุ้นให้แคลลัสเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 พบว่า สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยได้ตามลำดับ ความเข้มข้นสูงสุดของซีโฟแทกซิมที่แคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 สามารถทนได้คือ 500 และ 700 มก./ล. ตามลำดับ ความเข้มข้นสูงสุดของไฮโกรมัยซินที่แคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 สามารถทนได้คือ และ 30 และ 40 มก./ล. ตามลำดับ ความเข้มข้นสูงสุดของซีโฟแทกซิมที่แคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 สามารถเจริญได้คือ 700 และ 800 มก./ล. ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นสูงสุดของกานามัยซินที่แคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ยังสามารถทนได้คือ 1,250 และ 1,500 มก./ล. ตามลำดับ

เมื่อทำการส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ที่มียีน chitinase *hpt* gene เป็นยีนเครื่องหมาย และ *gus* gene เป็นยีนรายงานผล พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* คือ 90 นาที ส่วนการศึกษาการส่งถ่ายยีน chitinase สู่อ้อยโดยใช้ particle bombardment พบว่า แรงดันของก๊าซฮีเลียมที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อย คือ 900 ปอนด์/ตร.นิ้ว โดยมีระยะห่างระหว่าง stopping screen กับแคลลัสของอ้อยเท่ากับ 9 ซม. เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนพบการแสดงอออกของยีน *gus* และตรวจสอบการสอดแทรกของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) พบว่า มีการสอดแทรกของยีน chitinase 35S promoter และ NOS terminator และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR ไม่พบการแสดงออกของยีน chitinase ในอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน สำหรับการส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้ *A.* tumefaciens train LBA 4404 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 และ pBI 121 พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* คือ 50 และ 30 นาที ตามลำดับ ส่วนการศึกษาการส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้วิธี particle bombardment จากการทดลองพบว่า แรงดันของก๊าซฮีเลียมที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อย คือ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว ระยะห่างที่เหมาะสมระหว่าง stopping screen กับแคลลัสของอ้อยเท่ากับ 9 ซม. ซึ่งเมื่อตรวจสอบการ

แสดงออกของยีนพบการแสดงออกของยีน *gus* และเมื่อตรวจสอบการสอดแทรกของดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) พบว่า มีการสอดแทรกของยีน chitinase 35S promoter และ NOS terminator ในแคลลัสอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีน chitinase ในอ้อย ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pBI 121 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน chitinase ในอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้พลาสมิด pCAMBIA1305.1

Abstract

The objective of this study was to transfer chitinase gene into sugarcane cv. Phil 66-07 and cv. Mitr Phol 99-94. Young leaves of sugarcane cv. Phil 66-07 were cultured on the modified MS medium supplemented with various concentration of 2,4-D, NAA, yeast extract and coconut water. The highest percentage for callus induction was obtained from the MS medium supplemented with 3 mg/l 2,4-D and 15% (v/v) coconut water. The callus of sugarcane cv. Phil 66-07 were successfully regenerated on MS supplemented with 1 mg/l BA and 0.5 mg/l IBA. The callus of sugarcane cv. Mitr Phol 99-94 were successfully regenerated on MS medium supplemented with 3 mg/l BA and 0.5 mg/l IBA. The experiments were performed to determine the effect of antibiotics on regeneration of sugarcane. It was found that calli and plantlets of sugarcane cv. Phil 66-07 were completely inhibited by hygromycin concentration at 25 mg/l and 50 mg/l, respectively. The highest concentrations of cefotaxime that calli and plantlets of sugarcane cv. Phil 66-07 could tolerate were 500 and 700 mg/l. respectively. Calli and plantlets of sugarcane cv. Mite Phol 99-94 were completely inhibited by hygromycin concentration at 30 mg/l and 40 mg/l, respectively. The highest concentrations of cefotaxime that calli and plantlets of sugarcane cv. Mitr Phol 99-94 could tolerate were 700 and 800 mg/l. respectively. The highest concentrations of kanamycin that calli and plantlets of sugarcane cv. Mitr Phol 99-94 could tolerate were 1,250 and 1,500 mg/l. respectively

Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane cv. Phil 66-07 were conducted using plasmid pCAMBIA 1305.1 with chitinase and gus gene. The optimal co-cultivation time for sugarcane was 90 minutes. Particle bombardment was also used in this experiment. The results revealed that the optimal helium pressure for sugarcane was 900 psi. The optimal distance from stopping screen to sugarcane callus was 9 cm. The GUS assay revealed the gus activity while the PCR method indicated the integration of chitinase gene, 35S promotor and NOS terminator in transgenic calli of sugarcane. A study on expression of chitinase gene in transgenic and non-transgenic susgarcan cv. Phil 66-07 by RT-PCR revealed negative results. The genetic transformation of sugarcane cv. Mitr Phol 99-94 mediated by *Agrobacterium* strain LBA 4404, which harbored the plasmid pCAMBIA 1305.1and the plasmid pBI 121 was used in the procedure. The results revealed that the optimal co-cultivation time was 50 and 30 minutes, respectively. The genetic transformation of sugarcane cv. Mitr Phol 99-94 using particle bombardment was also used in this experiment. The results revealed that the optimal

helium pressure for sugarcane was 1,100 psi. The optimal distance from stopping screen to sugarcane calli was 9 cm. The GUS assay revealed the gus activity while the PCR method indicated the integration of chitinase gene, 35S promoter and NOS terminator in transgenic calli of sugarcane. A study on expression of chitinase gene in transgenic and non-transgenic sugarcane cv. Mitr Phol 99-94 by RT-PCR revealed that chitinase was inserted in transgenic sugarcane when the plasmid pBI 121 was used whereas the plasmid pCAMBIA 1305.1 did not show expression of chitinase gene.