

ผลการทดลองที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับเชื้อ *A.*

***tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1)**

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ร่วมกับแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 เป็นเวลา 0 , 30, 60, 90 และ 120 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อ *A. tumefaciens* ส่งถ่ายยีนที่ต้องการให้กับแคลลัสอ้อย กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกจากแคลลัสอ้อย โดยล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซีโฟแทกซึมความเข้มข้น 500 มก./ล. เพื่อฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* ไม่ให้ก่อโรคต่อพืช แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีซีโฟแทกซึมความเข้มข้น 500 มก./ล. และไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25 มก./ล. ต่อจากนั้นจึงคัดเลือกแคลลัสอ้อยที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยสามารถประเมินระดับการแสดงออกของยีนเป็น 4 ระดับคือ 0 ไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* +1 มีการแสดงออกของยีน *gus* ต่ำ เนื้อเยื่อมีสีฟ้าเล็กน้อย +2 มีการแสดงออกของยีน *gus* ปานกลาง เนื้อเยื่อมีสีฟ้าปรากฏค่อนข้างมาก +3 มีการแสดงออกของยีน *gus* สูง เนื้อเยื่อมีสีฟ้าปรากฏมาก +4 มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงมากเนื้อเยื่อมีสีฟ้าเข้มปรากฏมากที่สุด จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มแคลลัสร่วมกับ *Agrobacterium* 90 และ 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์และระดับการแสดงออกของยีนสูงสุดโดยให้ค่าความเข้มสีฟ้ามากที่สุด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 48) จากการนำระดับการแสดงออกของยีน *gus* ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ที่ระยะเวลาการบ่ม 90 และ 120 นาที ระดับการแสดงออกของยีน *gus* ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 49 และ 50)

ตารางที่ 2 ระดับการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)	ระดับการแสดงออกของยีน
0	0
30	+
60	+++
90	++++
120	++++

หมายเหตุ; ++++ ดีที่สุด +++ ดีมาก ++ ดี + ปานกลาง 0 ไม่มี