ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม น้ำมะพร้าว 2,4-D และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อาหารสูตร MS ที่เติม				น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย (ก.) ± std.Error	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	น้ำมะพร้าว (%)	yeast extract (mg/l)		
1	3	0	0	0	0.9460±0.0695	100
2	3	0	15	0	1.0200±0.0758	100
3	3	0	0	20	0.6350±0.0946	100
4	0	3	0	0	0.3367±0.1832	100
5	0	3	15	0	0.5067±0.0816	100
6	0	3	0	20	0.1383±0.0828	100

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น/แคลลัสของอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรอาหาร	อาหารสูตร MS ที่เติม		จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัส ± std.Error	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น/แคลลัส
	BA (มก./ล.)	IBA (มก./ล.)		
1	0	0	1.8±0.1004	60
2	0.5	0.5	16.5±0.0653	100
3	1	0.5	39.1±0.0394	100
4	2	0.5	24.0±0.0708	100
5	3	0.5	13.7±0.0979	100
6	4	0.5	4.8±0.1305	80

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 9 จำนวนรากเฉลี่ย/ต้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก/ต้นของอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรอาหาร	อาหารสูตร MS ที่เติม		จำนวนรากเฉลี่ย/ต้น ± std.Error	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก/ต้น
	NAA (มก./ล.)	น้ำตาลซูโครส (มก./ล.)		
1	1	30	1.1±0.0790	60
2	1	50	2.8±0.0509	100
3	3	30	4.1±0.0757	100
4	3	50	5.4±0.0617	100
5	5	30	14.5±0.0324	100
6	5	50	21.8±0.0350	100

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 10 จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น/แคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สูตรอาหาร	อาหารสูตร MS ที่เติม		จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัส ± std.Error	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น/แคลลัส
	BA (มก./ล.)	IBA (มก./ล.)		
1	0	0	14.4±0.8718	100
2	0.5	0.5	13.6±2.8914	100
3	1	0.5	10.4±2.9428	100
4	2	0.5	19.6±1.0770	100
5	3	0.5	20.0±1.7029	100
6	4	0.5	2.6±0.8124	80
7	0.5	1	2.6±1.6613	60
8	0.5	2	15.2±3.2156	100
9	0.5	3	15.0±2.2136	100
10	0.5	4	3.2±2.1771	40

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 11 สารละลายต้นตอของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog's (MS)

ส่วนประกอบ	จำนวน (มก./ล.)	ปริมาตรที่ใช้จริง (มก./ล.)
สารละลายต้นตอ I		
NH_4NO_3	33,000	50
KNO_3	38,000	
$CaCl_2.2H_2O$	8,800	
$MgSO_4.7H_2O$	7,400	
KH_2PO_4	3,400	
สารละลายต้นตอ II		
KI	166	5
H_3BO_3	1,240	
$MnSO_4.4H_2O$	4,460	
$ZnSO_4.7H_2O$	1,720	
$Na_2MoO4.2H_2O$	50	
$CuSO_4.5H_2O$	5	
$CoCl_2.6H_2O$	5	
สารละลายต้นตอ III		
$FeSO_4.7H_2O$	5,560	5
$Na_2.EDTA.2H_2O$	7,460	
สารละลายต้นตอ IV		
Inositol	20,000	5
Nicotinic acid	100	
Pyridoxine HCl	100	
Thiamine HCl	100	
Glycine	400	

อาหารสูตร LB (Luria Broth)

Bacto-tryptone	10 g/l
Bacto-yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

pH 7.0

(ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็งเติม bacto-agar 18 g/l)

การเตรียมสารละลาย X-gluc (X-gluc assay buffer)

94 ml phosphate buffer

1 ml Triton/ethanol

5 ml X-gluc stock

ส่วนประกอบของ phosphate buffer

100 mM KH_2PO_4 : 100 mM K_2HPO_4 ในอัตราส่วน 1:1 (v/v)

ส่วนประกอบของ Triton/ethanol

10 ml Triton X-100

40 ml 100% ethanol

50 ml H_2O

ส่วนประกอบของ X-gluc stock

50 mg X-gluc

5 ml DMSO (Dimethyl Sulfoxide)

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

Extraction buffer

- 20 mM EDTA
- 100 mM Tris-base (pH 8.0)
- 1.4 M NaCl
- 2.0% (w/v) CTAB
- 1.0% PVP-40

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนใช้เติม

2-mercaptoethanol 1 µl ต่อสารละลาย extraction buffer 1 ml

TE buffer

- 10 mM Tris-base (pH 8.0)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5X TBE

- 54 g Tris-base
- 27 g Boric acid
- 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

10mg/ml /RNase A

ชั่ง RNase A 10mg/ml ละลายใน 10 mM Tris-HCl (pH7.5) และ 15 mM NaCl นำมาอุ่นที่ 100 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วเก็บที่ -20 ^{0}C

ภาคผนวก ค

การสกัดพลาสมิดจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1)

สกัดพลาสมิดโดยวิธี Plasmid Minipreparation (Serghini *et al*., 1989 อ้างใน ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2542) โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหารเหลว LB เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 ^{o}C นานข้ามคืน นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมา 10 มล. ใส่ในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. ดูดสารละลายด้านบนทิ้งไป ละลายตะกอนด้วย TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8,NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) 350 µl
3. เติม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25: 24 : 1) ปริมาตร 350 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายด้านบนไปใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 7.5M ammonium acetate ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2M
5. เติม 95% เอทานอล ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย70% เอทานอล ผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 µl
7. เติม Rnase A (10 mg/ml) 2 µl นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA
8. เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ในตู้แช่แข็ง -20 ^{o}C

การล้างกระสุนทองคำและทังสเตน

การล้างกระสุนทองคำและทังสเตนในขั้นตอนนี้ใช้สำหรับการยิง 120 ครั้ง (Sanford *et al*., 1993)

1. ชั่งกระสุนมา 30 มก. ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.
2. เติม 70% เอทานอล (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มล.
3. vortex ความเร็วสูง 3-5 นาที
4. แช่กระสุนใน 70% เอทานอล ทิ้งไว้ 15 นาที
5. ทำให้กระสุนตกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยง 5 วินาที ดูดสารละลายทิ้งไป

6. ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้ซ้ำ 3 ครั้ง

- เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มล.
- vortex ความเร็วสูง 1 นาที
- ทำให้กระสุนตกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยง 2-3 นาที
- ดูดสารละลายทิ้งไป

7. เติม sterile 50% glycerol 500 µl เก็บกระสุนที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C หรืออุณหภูมิห้อง

การเคลือบกระสุนทองคำและทังสเตนด้วยพลาสมิด

ขั้นตอนการเคลือบกระสุนดังต่อไปนี้ใช้สำหรับการยิง 6 ครั้ง (Sanford *et al*., 1993)

1. นำกระสุนที่เก็บใน sterile 50% glycerol มา vortex 5 นาที เพื่อกันกระสุนตกตะกอน ดูด
2. กระสุน 50 µl ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.
3. vortex ความเร็วสูง ตลอดเวลาขณะที่เติม
   - DNA 5 µl (1 µg/ 1 µl)
   - 2.5 M $CaCl_2$ 50 µl
   - 0.1 M spermidine (free base, tissue culture geade) 20 µl
4. vortex ต่อไป 2-3 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที
6. ทำให้กระสุนตกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยง 2 วินาที ดูดสารละลายทิ้งไป
7. เติม 70% เอทานอล 140 µl แล้วดูดสารละลายทิ้งไป
8. เติม 100% เอทานอล 140 µl แล้วดูดสารละลายทิ้งไป
9. เติม 100% เอทานอล 48 µl ทำให้กระสุนละลายโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ หรือ vortex 2-3 วินาที

การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

1. ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์

- เตรียม rupture disk ที่ปลอดเชื้อใน retaining cap
- เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่เคลือบอยู่บนกระสุนทองคำโดยหยดบน macrocarrier และทำการประกอบ macrocarrier holder , space ring และ stopping screen ให้ระยะห่างเหมาะสมตามที่ต้องการ
- นำ rupture disk , macrocarrier และ plate ที่ใส่ตัวอย่างเข้าไปประกอบในเครื่อง

2. ขั้นตอนการใช้ particle bombardment

- เปิดวาล์วถังก๊าซฮีเลียมให้ความดันสูงกว่า rupture disk ประมาณ 200 psi

- เปิด power switch

- กดปุ่ม vac เพื่อดูดอากาศออกจนเข็ม vacuum gauge ถึงประมาณ 25 – 26 นิ้วปรอท

- กดไปที่ hold (ข้าม vent) เพื่อเตรียมยิง กดปุ่มยิง (fire switch) โดยกดแช่จนกระทั่งได้ยินเสียงดัง กดปุ่ม vent เพื่อให้อากาศเข้า

- เมื่อเสร็จสิ้นการยิง rupture disk จะแตก

3. ข้อควรระวัง

เครื่องนี้ใช้ไฟ 110 V ห้ามถอดปลั๊กระหว่างทำงาน ควรปิดประตูเครื่องให้สนิท ระหว่างการยิงทุกขั้นตอนของการใช้เครื่องนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อทำการยิงเสร็จสิ้นควรปิดวาล์วถังก๊าซฮีเลียมทั้ง 2 วาล์วโดยการทำการหมุนเกลียวออก

การสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสอ้อย โดยวิธี Doye & Doye (1987)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน โดยใช้วิธีของ Doye & Doye (1987) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างพืช 0.2 กรัมบดในโกร่งปลอดเชื้อโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จนเป็นผงละเอียด แล้วเติม 2% CTAB buffer 1,000 µl

2. เทของเหลวลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 30 นาที โดยพลิกหลอดไปมาเป็นระยะ

3. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) จนเต็มหลอด

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่

5. ทำซ้ำข้อ 3 และข้อ 4 อีก 1 รอบ

6. เติม isopropanol 0.7 เท่า ของปริมาตรเดิม นำไปปั่นเวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนบนทิ้งไป

7. เติม 75% เอทานอล ที่มี 10 mM ammonium acetate ปริมาตร 400 µl กลับหลอดไปมาให้ตะกอนละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

8. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงระยะเวลาสั้น ๆ เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 75% เอทานอล ปริมาตร 800 µl ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง คว่ำหลอดทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอนแห้ง

10. เติม TE buffer 40 µl และ Rnase A 1 µl นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 30 นาที

11. เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 ^{o}C

12. วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมา 5 µl เติมน้ำกลั่น 995 µl วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

13. คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สูตร

DNA concentration (µg/ml) =A_{260}x 50 µg / ml x dilution factor