บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. การศึกษาความเข้มข้นสารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกินที่มีผลต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนต่าง ๆ และการชักนำแคลลัส

นำชิ้นส่วน ใบ, ก้านใบ, ลำต้น, และราก ของต้นหน้าวัว ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มก./ล. และ TDZ 0.5 มก./ล. อายุ 8 สัปดาห์ และสารปฏิชีวนะแวนโคมัยซินเข้มข้น 0 100 200 300 และ 400 มก./ล. ซีโฟทาซิมเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 มก./ล. มีโลเพนเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. คานามัยซินเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายในขวด 8 ออนซ์บรรจุอาหาร 20 มล. แต่ละสิ่งทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ชิ้น ในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัส ขนาดแคลลัส จำนวนยอดเปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วน และความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (completely ramdomized design) ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ DMRT (Duncan's mutiple range test)

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะกำจัดเชื้อส่วนเกินที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

เชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่อินคูเบทในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมให้ทั่วอาหารแข็ง LB ในจานเพาะเชื้อขนาด 9 ซม. หยดสารปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน ซีโฟทาซิม และมีโลเพน ที่ความเข้มข้น 0.2 0.3 และ 0.4 มก./ล. บ่มเชื้อในสภาพมืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณขนาดพื้นที่วงใส (clear zone) เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้

3. ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะคัดเลือก ที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต และการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อ

ใช้ชิ้นส่วนข้อ ในหลอดทดลองวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS อายุ 8 สัปดาห์ เติมไฮโกรมัยซินเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายในขวด 8 ออนซ์ บรรจุอาหาร 20 มล. แต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT

4. ศึกษาระยะเวลาการจุ่มแช่ และวิธีการเลี้ยงร่วมที่มีผลต่อ การปลูกถ่ายยีน

ใช้ชิ้นส่วนข้อในหลอดทดลองอายุ 8 สัปดาห์ จุ่มแช่เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่ผ่านการอินคูเบทบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 15 30 45 นาที หลังจากนั้นซับเชื้อส่วนเกินด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อเลี้ยงร่วมด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้คือ

วิธีที่ 1 เลี้ยงบนกระดาษกรอง 2 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน

วิธีที่ 2 เลี้ยงบนการะดาษกรอง 2 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหารเติมซีโฟทาซิม

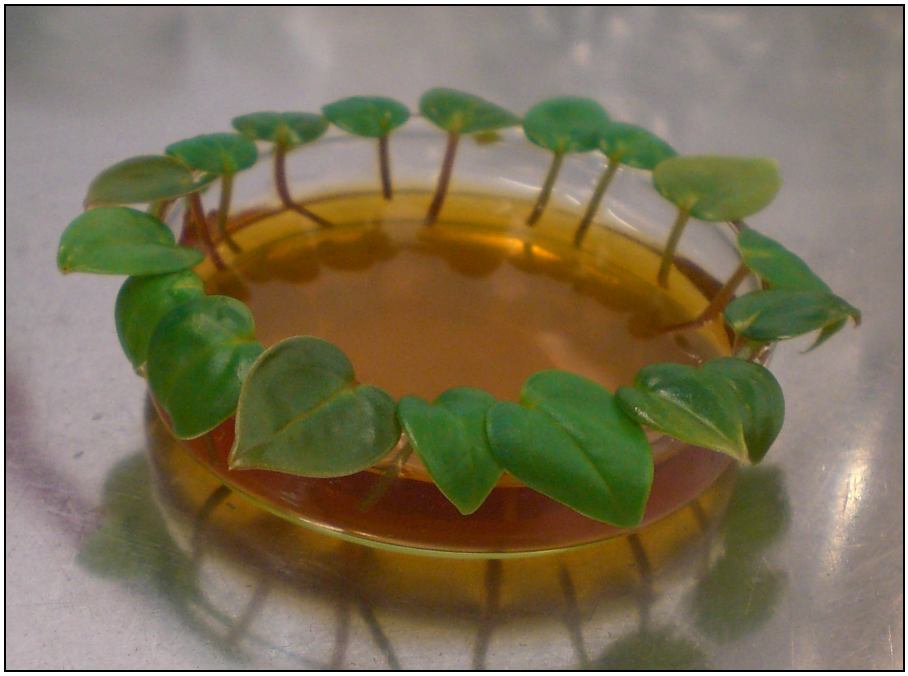
วิธีที่ 3 เลี้ยงบนอาหาร MMS 2 วัน ล้างด้วยน้ำกลั่นเติมซีโฟทาซิม

วิธีที่ 4 วางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารเติมซีโฟทาซิม ย้ายเลี้ยงบนอาหารเติมไฮโกรมัยซิน

วิธีที่ 5 จุ่มแช่ก้านใบที่มีแผ่นใบติดมาด้วยกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมวางเลี้ยงอาหาร MMS (ภาพที่ 1) และ (ภาพที่ 2)

แต่ละการทดลองเพาะเลี้ยงภายในขวด 8 ออนซ์บรรจุอาหาร 20 มล. แต่ละสิ่งทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงภายในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียสย้ายเลี้ยงทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อได้แคลลัสบันทึกเปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยการนำแคลลัสหน้าวัวที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนใสจานหลุม 1 ชิ้นต่อหลุม แล้วเติมส่วนผสมของสารละลาย X-gluc เข้มข้น 1ไมโครโมลาร์ นำไปอินคูเบท ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างคลอโรฟิลล์ออกด้วยเมธานอลเข้มข้น 95

เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้ง บันทึกผลการเกิดจุดสีน้ำเงิน (blue spot) โดยวิธีแผนการทดลองแบบ CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT



ภาพที่ 1 การจุ่มแช่ชิ้นส่วนก้านใบที่มีแผ่นใบติดมาด้วยร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ภาพที่ 2 การวางเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบที่มีแผ่นใบติดมาด้วยโดยวางแผ่นใบเลี้ยงบนอาหาร MMS หลังจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

5. ศึกษาความหนาแน่นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมต่อการปลูกถ่ายยีน

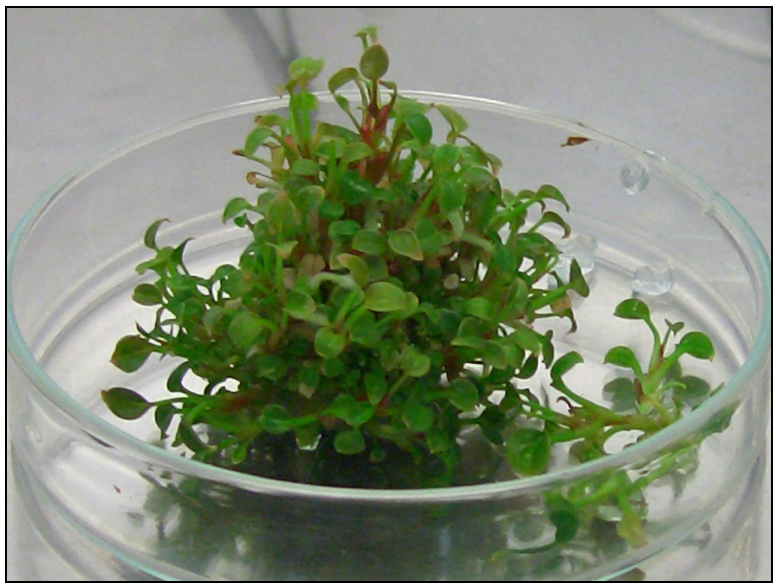
นำชิ้นส่วนข้อจุ่มแช่เชื้ออะโกรแบคทีเรียมในอาหารเหลว LB ที่อินคูเบทเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหนาแน่น 3 ระดับ โดยวัดความหนาแน่นของเซลล์ ให้มีค่า OD_{600} 1.634 0.817 และ 0.4085 เลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 15 นาที ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารอีก 2 วัน ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นเติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 มก./ล. ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อกำจัดเชื้อส่วนเกินย้ายเลี้ยงอีกครั้งบนอาหารเติมไฮโกรมัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. เพาะเลี้ยงภายในขวดขนาด 8 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหาร 20 มล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่ละความหนาแน่นเชื้อของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 บันทึกอัตราการสร้างแคลลัส ขนาดแคลลัส การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในแต่ละความหนาแน่นเชื้ออะโกรแบคทีเรียม บันทึกผลการเกิดจุดสีน้ำเงิน (blue spot) เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ตรวจสอบวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้ต้นหน้าววัวสายพันธุ์โซเนตอายุ 8 สัปดาห์ ต้นดังกล่าวได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารเหลวสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก./ล. (ภาพที่ 3)



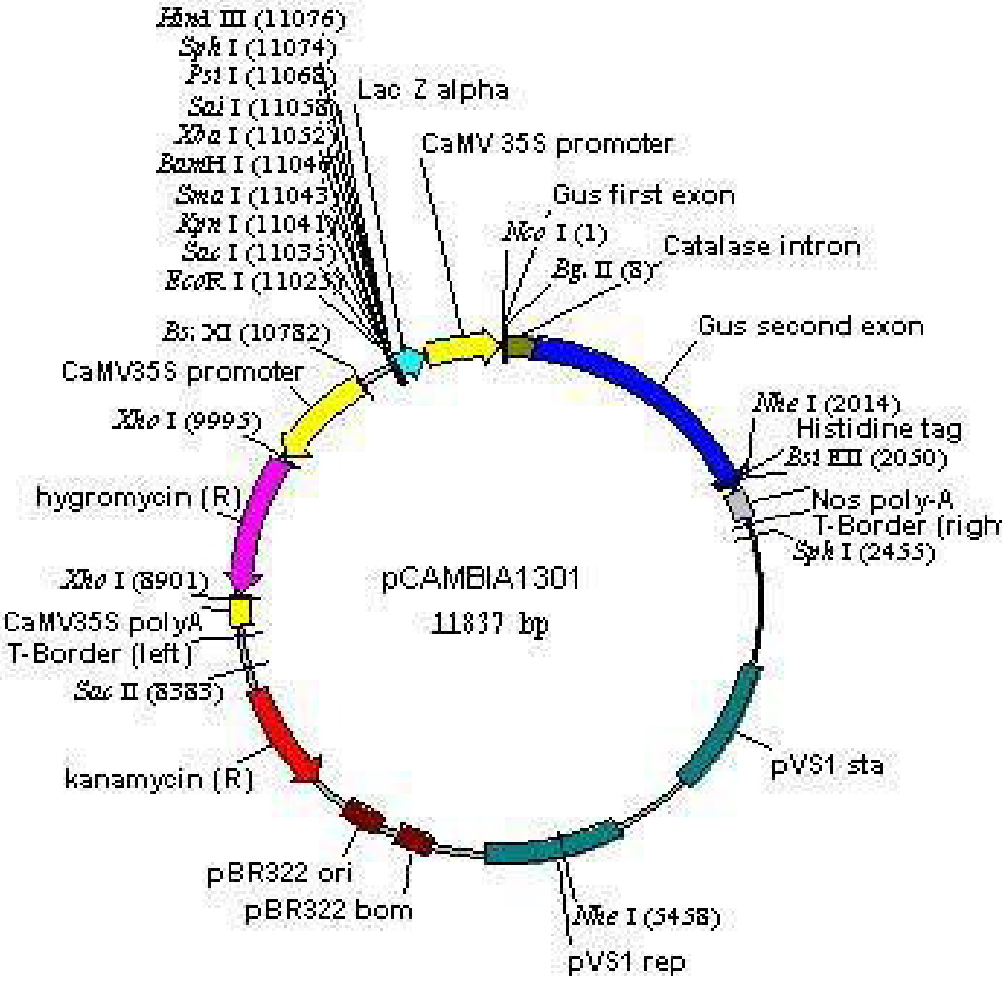
ภาพที่ 3 ต้นหน้าววัวพันธุ์โซเนตในหลอดทดลองที่ใช้ในการศึกษา

1. 2 สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหน้าววัวเป็นอาหารสูตร MMS ซึ่งดัดแปลงจากสูตร MS เดิม โดยลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักบางตัวลงครึ่งหนึ่งจากสูตรเดิมเหลือความเข้มข้น ดังนี้คือ NH_4NO_3 825 มก./ล. KNO_3 950 มก./ล. KH_2PO_3 85 มก./ล $FeSO_4 7H_2O$ 13.9 มก./ล. Na_2EDTA 18.6 มก./ล. และเติมอะดีนีนซัลเฟตปรับ pH 5 .7 นำมานึ่งฆ่าเชื่อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม. นาน 15 นาที

1. 3 เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายเชื้อ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ประกอบด้วยยีน *gus* อยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ nopaline synthase polyadenylation (NOS polyA) และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อ ไฮโกรมัยซินอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S promoter และ CaMV35S polyadenylation (CaMV35S polyA) และมียีนต้านทานคานามัยซินเป็นยีนที่คัดเลือกในแบคทีเรียม (ภาพที่ 4) อินคูเบทที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 สัปดาห์



ภาพที่ 4 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด โครงสร้างดีเอ็นเอ pCAMBIA 1301

ที่มา : สุภาวดี (2548)

1.4 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MMS
- สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น TDZ และ BA
- น้ำตาลซูโครส
- วุ้นตรานางเงือก
- สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ซีโฟทาซิม แวนโคมันซิน มีโลเพน และคานามัยซิน
- สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของ *gus* คือ X-gluc โซเดียมโฮโดเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมเอทธิลีนไดอะมีนเตตราอะซิเตท ติตรอนเอ็กซ์ โซเดียมลอริลซาโคซินซัลเฟต และเบต้าเมอแคปโตเอทานอล
- เมธานอล 95 เปอร์เซ็นต์

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้อบไมโครเวฟ
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น จานเพาะเชื้อ ฟลาสค์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
- ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง

2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- พาราฟิล์ม
- ชุดกรองมินิพอร์สำหรับกรองสารปฏิชีวนะ
- มีดผ่าตัด
- ลูปสำหรับเขี่ยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม
- ปากคีบ

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายยีน

- ไมโครไปเปต พร้อมทิปนึ่งฆ่าเชื้อ
- กระดาษกรอง
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ
- ถุงมือยาง
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
- นาฬิกาจับเวลา
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- กล้องถ่ายรูป