บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 บอนสีที่ใช้ในการทดลองมาจาก 3 แหล่ง ดังนี้

1. บอนสีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 28 สายพันธุ์ จากเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
2. บอนสีที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์จำนวน 15 สายพันธุ์จากสมาคมส่งเสริมและอนุรักษ์บอนสีแห่งประเทศไทย ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
3. บอนสีที่ใช้ในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและศึกษาการถ่ายยีนโดยวิธีเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย คือบอนสีพันธุ์อิเหนา จากสวนยางพาราของคุณสมนึก คุ้มแว่น บ้านสามแยกอาเส็น หมู่ 5 ต.ยะหา อ.ยะหา จ.ยะลา 95000

1.2 พลาสมิดและแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

1. แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 จาก ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ห้องปฏิบัติการ Plant Transgenic Technology ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 (Invitrogen, California)
3. พลาสมิด pDFR 81 ซึ่งมีส่วนประกอบของยีน DFR ภายใต้การควบคุมของ 35S promoter และ nos terminater

1.3 วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
   - -สมุดจดบันทึก
   - -ปากกาจดบันทึก
   - -กล้องถ่ายภาพดิจิตอล ยี่ห้อ Samsung รุ่น Digimax401

2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCRและการโคลน

-โกร่งบดตัวอย่าง

-ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วสำหรับใส่สารเคมีขนาด 100-500 มิลลิลิตร

-เครื่องปั่นแห้ง (evaporator) (Eyela, Japan)

-เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen, Germany)

-เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

-เครื่องส่องดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต UV Transilluminator (Ultra Lum Electronic Dual Light ™ Transilluminator, USA)

-ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส

-เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) (BIO RAD Gene Cycler™, USA)

-เครื่องเขย่า (Vortex Geni, USA)

-เครื่องเจลแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (Mupid Advance Co,. Ltd, Japan)

-เครื่องชั่งไฟฟ้า (Libror EL-120HA (Shimadzu, Japan)

-ตู้เขี่ยเชื้อ (Augusta safety cabinet (Lio Lab Co,. Ltd.)

-อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ ได้แก่ loop แท่งแก้วสามเหลี่ยม ตะเกียงแอลกอฮอล์

-เตาไมโครเวฟ

-หลอด PCR

-Micropipette p 20, p 200, p 1,000 (Gilson)

-ปิเปตทิปขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

3. วัสดุอุปกรณ์ทางการเกษตร

-ดินผสมใบก้ามปูสำหรับปลูกพืช

-กระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว

-กะละมังพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว

4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

-ตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีบรรยากาศปลอดภัย (Laminar Flow)

-เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

-หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

-เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และทศนิยม 4 ตำแหน่ง

-เครื่องเขย่า (laminar shaker orbital)

-ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) (Schwabach, Germany)

-ตู้เย็น

-เครื่องปรับอากาศ

-เครื่องทำน้ำกลั่น

-เครื่องมือผ่าตัด ประกอบด้วยมีด ปากคีบ กรรไกร

-อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ กระบอกตวง ฟลาสก์ บีกเกอร์ จานแก้ว

-อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ อลูมิเนียมฟอยด์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระดาษทิชชู

1.4 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCRและการโคลน

1.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB (Merch, USA)

-chloroform / isoamyl alcohol

-phenol / Chloroform

-isopropanol

-TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)

-50X TAE buffer

-loading buffer

-ethidium bromide solution

-RNase solution (Promega, USA)

-agarose powder (FMC, USA)

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

-10X *Taq* DNA polymerase buffer

-*Taq* DNA polymerase

-$MgCl_2$

-dNTP

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

-Topo TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)

-antibiotic (Ampicilin)

1.4 สารอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย

-อาหาร LB (Sambrook *et al.*, 1989)

-อาหาร SOB (Sambrook *et al.*, 1989)

-อาหาร SOC (Sambrook *et al.*, 1989)

2. สารเคมีทางการเกษตร

-ปุ๋ยเคมีชนิดละลายช้า ออสโมโคส (Osmocote) สูตร 16-16-16

-สารฆ่าเชื้อรา ออโธไซด์ (Orthocide)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

-สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

-ผงวุ้น

-น้ำตาลซูโครส

-1 N NaOH

-1 N HCl

-สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (naphthalene acetic acid)

-สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-benzylaminopurine)

-แอลกอฮอล์ 95% และ 70%

-Mercuric Chloride ($HgCl_2$)

-น้ำยาทำความสะอาด (Chlorox)

-Tween 80

-Antibiotic (Kanamycin)

-Antibiotic (Cefoxtaxime)

2 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา

รวบรวมตัวอย่างบอนสี 28 สายพันธุ์ ถ่ายรูปลักษณะพันธุ์และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบอนสี ได้แก่ รูปร่างใบ ขอบใบ พื้นใบ ก้านใบ เส้นกลางใบและเส้นใบ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและบันทึกผลในรูปตารางจัดจำแนกบอนสีเป็นหมวดหมู่

2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบอนสีบนพื้นฐานดีเอ็นเอ

คัดเลือกตัวแทนบอนสีทั้งหมด 15 พันธุ์ พันธุ์ละ 2 ต้นมาเป็นตัวอย่างในการศึกษา

2.2.1 <u>สกัดดีเอ็นเอ</u>

นำใบบอนสีตัวอย่างละ 1 กรัมมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Murray and Thompson, 1980) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้รับโดยการวัด OD ที่ 260, 280 และ 320 nm หรือแยกภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยเทคนิค gel electrophoresis

2.2.2 เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

นำดีเอ็นเอตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP ตามหลักการของ Vos *et al.* (1995) ด้วยชุดวิเคราะห์ AFLP core reagent Kit ตามวิธีการที่ระบุในเอกสาร (Invitrogen, USA) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 กลุ่มซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

E-AA	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAA 3'
E-AAC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAC 3'
E-AAG	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAG 3'
M-CA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA 3'
M-CAA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAA 3'
M-CAC	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAC 3'

ทำการวิเคราะห์โดยใช้การเข้าคู่ของไพรเมอร์ ตามที่แสดงแบบพบกันหมดเป็น 9 คู่ไพรเมอร์ที่เป็นไปได้ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแยกด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis ใน 15% acrylamide ใน TBE buffer และย้อมแผ่นเจลด้วย silver stain (Streiff และคณะ, 1998) เพื่อให้แถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้น นำแผ่นเจลถ่ายลงในกระดาษแก้ว ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลและประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems) (Rohlf, 1993) โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Nei (Nei' similarity coefficient) จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า genetic distance ระหว่าง genotype ของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเพื่อสร้างเป็น genetic distance matrix ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Mean Arithmetic method (UPGMA) (Jneath และ Sokal, 1973)

2.2.3 ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ copia like transposon

คัดเลือกตัวแทนของบอนสี 7 สายพันธุ์จากตัวอย่าง 15 พันธุ์อย่างสุ่ม นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Ty1-copia like transposon โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ โคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM โดยเทคนิค TA cloning (Invitrogen, USA) คัดเลือกโคลนที่ได้และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีของ Sanger และคณะ (1997) ประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

F 5'-GGA ATT CGA YCT NAA RAC NGC NTT YYT-3'

R 5'-GGG ATC CAY RTC RTC NAC RTA NAR NA -3'

2.3 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของบอนสีด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.3.1 ศึกษาการตอบสนองของสูตรอาหารโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำชิ้นส่วนใบของบอนสีพันธุ์อิเหนาขนาด 0.5 x 0.5 ซม. เน้นสูตรอาหารที่กระตุ้นให้เกิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสและต้นโดยใช้อาหารสูตรพื้นฐาน Murashige and Skoog (1962) ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดได้แก่ NAA 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 1 และ 2 ppm และ BA 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 1 และ 2 ppm ตามลำดับ สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโตจากใบไปเป็นแคลลัสและต้นโดยวัดขนาดของแคลลัสนับจำนวนราก จำนวนยอดและความสูงที่ได้ในแต่ละสูตร เพื่อเปรียบเทียบหาระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจากใบไปเป็นแคลลัสและจากแคลลัสไปเป็นต้น โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ DMRT ทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ขวดละ 1 ชิ้น นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมช่วยวิเคราะห์

2.4 การศึกษาการถ่ายยีนสู่บอนสีด้วยวิธีชักนำด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated transformation)

เพิ่มปริมาณแบคทีเรีย Agrobacterium ที่มีพลาสมิด pDFR81 ในอาหารสูตร AB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชม.จนเชื้อขุ่น วัด OD ให้อยู่ในช่วง 0.5 – 1.0 เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป นำเนื้อเยื่อบอนสีขนาด 1 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กและนำมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อที่ได้โดยวิธี co-cultivation (Li *et al.*, 2004) เป็นเวลา 10 นาที ซับเชื้อส่วนเกินด้วยกระดาษซับที่ปลอดเชื้อจนแคลลัสแห้ง นำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ppm และ cefoxtaxime 25 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้แสง 3,000 lux 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หมั่นถ่ายอาหารเพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเจริญ จากนั้นถ่ายเนื้อเยื่อสู่อาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้น คัดเลือกแคลลัสและต้นที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินเพื่อตรวจสอบต่อไป

2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *dfr* ในเนื้อเยื่อบอนสีที่ได้รับการถ่ายยีน

นำชิ้นส่วนพืชที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB โดยละลายดีเอ็นเอในสารละลาย RNase TE นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการปรากฏของยีน *dfr* โดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์

Gen dfr F: 5'-ATG GAA GGA GGG ATT TTA TCA AAT GCC-3'

Gen dfr R: 5'-CCA TGA CAG CCA TGA ATG GCT TCA TC-3'

ที่เฉพาะเจาะจงกับบริเวณของ *dfr* ยีน ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมทำนองเดียวกัน สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธี Phenol นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาละลายในสารละลาย TE ที่มี RNase free DNase 5 u นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *dfr* ด้วยเทคนิค RT-PCR (Invitrogen, USA) โดยใช้ไพรเมอร์ DFR เช่นเดียวกับที่ปฏิบัติตอนต้น ด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยาที่ 93°C 1 นาที 55°C 1 นาที และ 73°C 1 นาที จำนวน 40 รอบนำ cDNA ที่ได้มาตรวจสอบโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ประเมินผลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม