สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

Study on Concentration of *Agrobacterium* for Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Transformation

โดย

นายนิติศักดิ์ หลักทอง

T109036

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สาขาวิ.....
เลขทะเบียน.....109036
วัน,เดือน,ปี.....-2 ส.ค. 2553

b.....
i.....

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมใน
การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

Study on Concentration of *Agrobacterium* for Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)
Transformation

โดย

นายนิติศักดิ์ หลักทอง

ได้รับการพิจารณาจาก

.....

(ผศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว)
อาจารย์ที่ปรึกษา
วันที่ ๒๑ เดือน พ.ค. พ.ศ ๒๕๕๒

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร. สมชาย กล้าหาญ)
หัวหน้าภาควิชาพืชสวน
วันที่ ๒๒ เดือน พ.ค. พ.ศ ๕๒

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
นักศึกษา	นายนิติศักดิ์ หลักทอง
รหัสประจำตัว	48040994
สาขา	การจัดการสิ่งแวดล้อมพืชสวน
ภาควิชา	พืชสวน
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ระดับความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาในการบ่มเชื้อรวมกับเนื้อเยื่อตายยอดจากเอมบริโอโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 (pBI121 DFR) ที่ระดับความเข้มข้น 1:10 นาน 10 นาที , 1: 10 นาน 30 นาที และ 1: 20 นาน 30 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกสูตร MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ +TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์และสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร + cefotoxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบน MS ในสัปดาห์ที่ 10 – 16 เพื่อทดสอบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีน โดยใช้ชิ้นส่วนของตายอดจากเอมบริโอพบว่าความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 (pBI121 DFR) และระยะเวลาในการบ่มเชื้อรวมกับเนื้อเยื่อตายอดจากเอมบริโอที่ดีที่สุด คือ ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* อัตราส่วน 1:10 ทำการบ่มร่วมกับเนื้อเยื่อเป็นเวลา 10 นาที มีคะแนนเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ คือ 1.40 คะแนน และมีการเจริญและขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอคือ 0.68 ตารางเซนติเมตร โดยมีลักษณะเป็นสีเขียวปนเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on Concentration of *Agrobacterium* for Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Transformation
Student	Mr. Nitisak Luktong
Student ID.	48040994
Major	Environmental Horticulture management
Department	Horticulture
Faculty	Agricultural Technology
Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanjana Saetiew

Abstract

The *Agrobacterium* concentration and duration of incubation was tested for transformation into apical bud of embryo. Concentation of *A.tumefaciens* strain AGL1 (pBI121DFR) and duration of incubation were used at 1:10 dilution for 10 min, 1:10 dilution for 30 min and 1:20 dilution for 30 min. All sample were cultured on Murashig and Skoog (1962) medium containing 40 µM NAA, 0.5 µM TDZ, 50 mg/l kannamycin and 300 mg/l cefotoxime for 8 weeks after that MS medium was applied for week 10 to week16. It was found *Agrobacterium* concentration ratio of 1:10 dilution, incubated for 10 min. The score of apical bud from embryo growth was 1.40 point and size of explants apical bud from embryo was 0.68 cm^2. The explants are green and yellow.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่อง การศึกษาความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก สามารถสำเร็จลุล่วงได้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนช่วยตรวจและแก้ไขเพิ่มเติมปัญหาพิเศษ ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบรูณ์มากที่สุด

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสศึกษาเล่าเรียน และขอขอบคุณรุ่นพี่ปริญญาโทรวมทั้งเพื่อน ๆ ทุกคนที่ช่วยให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนเป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือข้าพเจ้าตลอดมา

ขอบคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้ให้การศึกษาและอนุเคราะห์สถานที่ในการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงอุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมีในการทำปัญหาพิเศษ

นายนิติศักดิ์ หลักทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	I
สารบัญตาราง.....	II
สารบัญภาพ.....	III
สารบัญตารางผนวก.....	IV
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ตรวจเอกสาร.....	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง.....	3
การขยายพันธุ์บัวหลวง.....	6
การเพาะเลี้ยงแคลลัส.....	6
ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส.....	6
การถ่ายยีนในพืช.....	7
ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยวิธีการใช้ Agrobacterium.....	10
ยีนรายงานผลและยีนเครื่องหมาย.....	11
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens*	11
อุปกรณ์และวิธีการ.....	15
ผลการทดลอง.....	21
วิจารณ์ผลการทดลอง.....	24
สรุปผลการทดลอง.....	25
เอกสารอ้างอิง.....	26
ภาคผนวก.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การเจริญเติบโตของตายอดเอมจากบริโอที่ได้รับการถ่ายยีนที่ระดับ ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาต่างๆเลี้ยง บนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบน อาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10 - 16..... 22

2 คะแนนการเจริญเติบโตของตายอดจากเอมบริโอที่ได้รับการถ่ายยีนที่ระดับ ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาต่างๆเลี้ยง บนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบน อาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10 - 16..... 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกและตายอดจากเอมบริโอ.....	19
2	พลาสมิด pBI121 DFR	19
3	แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอหลังได้รับการถ่ายยีนที่มีพลาสมิด pBI121 DFR ที่ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1		
ตารางภาคผนวก ก		31
1	ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของMurashinge and Skoog (1962))	31
2	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (Yeast extract –Malt extract medium)	32
ตารางภาคผนวก ข		33
1	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 2	33
2	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 4	33
3	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 6	33
4	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 8	34
5	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 10	34
6	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 12	34
7	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 14	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ 1		หน้า
8	วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่16.....	35
9	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 2	35
10	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 4	36
11	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 6.....	36
12	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 8.....	36
13	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 10.....	37
14	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 12.....	37
15	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 14.....	37
16	วิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 16.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

บัวหลวงจัดเป็นไม้ตัดดอกที่คนนิยมกันมาก (สุชาดา ศรีเพ็ญ, 2530) เป็นพืชที่ขึ้นได้ง่าย จึงพบว่ามีทั้งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติและมีผู้ที่นิยมปลูกเพื่อประดับ ตลอดจนปลูกเป็นการค้าทั้งตัดดอกและเก็บฝักขาย ในปัจจุบันมีการปลูกนาบัวแทนนาข้าวในหลายพื้นที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกรสูงกว่าการทำนาข้าว และยังส่งออกไปขายยังต่างประเทศอีกด้วย จึงนับเป็นไม้ตัดดอกที่มีความต้องการใช้อย่างสม่ำเสมอในปริมาณมาก

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (เสริมลาภ วสุวัต, 2537) เนื่องจากบัวหลวงเป็นไม้น้ำ (สุชาดา ศรีเพ็ญ, 2530) เจริญเติบโตได้ดีในทุกพื้นที่ของประเทศไทยทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว ดังนั้นในปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ในหลายจังหวัดจึงหันมายึดการทำนาบัวเป็นอาชีพหลักเนื่องจาก เป็นพืชที่ใช้เงินลงทุนต่ำโดยต้นทุนการปลูกบัว 1ไร่ ในการลงทุนครั้งแรก ราคาประมาณไร่ละ 7,200 – 10,000 บาท (กระทรวงพาณิชย์ สำนักงานพาณิชย์จังหวัด ชลบุรี, 2538) นาบัวยังดูแลรักษาได้ง่ายกว่านาข้าว ใช้น้ำน้อยกว่า มีโรคและแมลงรบกวนน้อยกว่า นาข้าวตลาดมีความต้องการสม่ำเสมอและในปริมาณมาก บัวหลวงนอกจากจะเป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญแล้ว แทบทุกส่วนของต้นบัวหลวงยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีก เช่น ไหลหรือรากบัวนำมาเป็นอาหาร ใบบัวใช้ห่อของ กลีบดอกตากแห้ง ใช้มวนบุหรี่ ดอกใช้บูชาพระ เป็นต้น แม้ว่าบัวหลวงจะมีประโยชน์ในหลายๆด้าน แต่ยังมีปัญหาในด้านการตลาดคือ ดอกบัวมีน้ำหนักมาก ทำให้การขนส่งเป็นไปได้ยาก อายุการใช้งานค่อนข้างสั้นเพราะกลีบดอกจะเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล เกตุษา, 2531) รูปทรงของดอกและสีมีให้เลือกจำกัด (จารีย์ หอยทอง, 2519) จึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงให้มีต้นที่มีคุณภาพและผลผลิตมากพอที่จะส่งเสริมให้มีการปลูกเพื่อเป็นการค้า

จากสภาพปัญหาดังกล่าวมา จึงได้มีการนำเอาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมาใช้ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตามการถ่ายยีนเข้าสู่พืชให้ประสบความสำเร็จนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ จึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่พืชและวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1(pBI121 DFR) ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ขั้นตอนการศึกษา

แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

ตรวจเอกสาร

เตรียมอุปกรณ์

ทำการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จัดทำรูปเล่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

บัวหลวงเป็นพืชในอันดับ (Order) Ranales วงศ์ (Family) Nymphaeaceae (ณพพร ดำรงศิริ.2530) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaerth. ซึ่งเป็นวงศ์ของพืชล้มลุก มีอายุหลายปีและเป็นพืชน้ำทั้งหมด (ไชยา-ลดาวัลย์.2541) พืชในวงศ์นี้มีทั้งหมด 8 สกุล (Genus) 50 ชนิด (Species) ที่พบในประเทศไทยมีเพียง 3 สกุล คือ สกุลบัวหลวง (Genus Nelumbo Adans.), สกุลบัวสาย (Genus Nymphaea Lin.) และสกุลบัววิกตอเรีย (Genus Victoria Lindl.) (เสริมลาภ วสุวัต.2537; ไชยา-ลาวัลย์.2541)

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในสกุล Nelumbo Adans. (Backer and Bakhuizen.1963) พืชในสกุลนี้พบได้ทั่วไปมีทั้งหมด 2 ชนิดคือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. และ *Nelumbo lutea* Pers. (Burkill.1966) แต่ที่พบในประเทศไทยมีเพียงชนิดเดียว คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (สุชาดา ศรีเพ็ญ.2530 ; ไชยา-ลาวัลย์.2541)

Nelumbo lutea Pers. มีชื่อสามัญว่า American Lotus, Water Chinkapinหรือ Yellow Lotus มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเหนือ ใบมีสีน้ำเงินอมเขียวกว้าง 30-60 เซนติเมตร รูปร่างของใบมีลักษณะกลม (Bailey,1954) ดอกสีเหลืองขนาด 6-10 ดอกจะชูขึ้น 3 ฟุตจากพื้นน้ำ มีลักษณะดอกและใบคล้ายกับบัวหลวงของไทย แตกต่างกันที่สีของดอกจะเป็นเหลือง โดยบัวชนิดนี้มีผู้นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย แต่ทนต่อสภาพภูมิอากาศที่ร้อนไม่ได้จึงสูญพันธุ์ไป (กสิน สุวตะพันธ์.2500; คณิตา เลขะกุล.2535; ไชยา-ลาวัลย์. 2541)

Nelumbo nucifera Gaertn. หรือ *Nelumbium speciosum* Will. หรือ *Nelumbo indica* Pers. หรือ *Nelumbium nelumbo* (L) Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred lotus, East Indian lotus, Egyptian lotus (รัชนี ฉวีราช.2532) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา เลขะกุล.2535) อินเดีย เปอร์เซีย ตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ จีน ทิเบต (Core.1955) และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย บัวสกุลนี้ อาจจำแนกได้เป็น 6 พันธุ์ โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของวิชาพฤกษอนุกรมวิธาน และพันธุศาสตร์ ดังนี้ (สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย.2520 ; ณพพร ดำรงศิริ.2530)

พันธุ์ที่ 1 มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู หรือปทุม ประทุม ปทุมมาลย์ โกกระณต โกกนุท บัวแหลมแดง บัวหลวงแดง หรือ ปัทมา ดอกสีชมพูขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลายเรียว ประกอบด้วยกลีบเลี้ยงขนาดเล็กเรียงตัวซ้อนกัน 2 ชั้น ส่วนกลีบดอกสีชมพูโคนสีเหลืองอ่อน เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นประมาณ 3 ชั้น ล้อมรอบฐานรองดอก เส้นกลีบดอกเห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 2 มีชื่อว่า บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว หรือ บัวแหมขาว ดอกสีขาวขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่คล้ายพันธุ์บัวหลวงชมพู กลีบเลี้ยงเรียงเป็น 2 ชั้น ด้านนอกสีขาวอมเขียว ด้านในสีอ่อนเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โค้งหรือโปร่งตรงกลาง กลีบดอกเรียงซ้อนกัน 3 ชั้น กลีบชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง ด้านนอกกลีบสีเหลืองอมเขียว ด้านในสีอ่อนกว่า เส้นบนกลีบดอกสีขาวเห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 3 มีชื่อว่า สัตตบงกช บัวหลวงชมพูซ้อน บัวหลวงป้อมแดง บัวฉัตรแดง หรือ บัวฉัตรชมพู ดอกสีชมพูขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ทรงป้อม จำนวนดอกมีน้อยกว่าพันธุ์บัวหลวงชมพู และบัวหลวงขาว กลีบเลี้ยงเป็นรูปรีเล็ก เรียงซ้อนกัน 2-3 ชั้น สลับกัน ด้านนอกและด้านในของกลีบเลี้ยงจะมีสีเขียวอมชมพู กลีบดอกรูปไข่กว้างกว่าส่วนบน กลีบดอกสีชมพูตลอด แต่ส่วนโคนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีขาวอมเหลือง เส้นกลีบมองไม่เห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 4 มีชื่อว่า สัตตบุษย์ บัวหลวงขาวซ้อน บัวฉัตรขาว หรือ บัวป้อมขาว ดอกสีขาวขนาดใหญ่ ดอกตูมรูปไข่ทรงป้อมเช่นเดียวกับสัตตบงกช กลีบเลี้ยงสีเขียวอมขาวเรียงซ้อนกันส่วนกลีบดอกสีขาวตลอด ทรงกว้างเรียงซ้อนกัน 3-4 ชั้นสวยงาม เส้นบนกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมองไม่เห็นเด่นชัด

พันธุ์ที่ 5 มีชื่อว่า บัวเข็มสีชมพู บัวปักกิ่งชมพู หรือ บัวหลวงจีนชมพู ดอกสีชมพูรูปไข่คล้ายกับพันธุ์บัวหลวงชมพู แต่ดอกมีขนาดเล็กกว่า กลีบเลี้ยงสีชมพูอมเหลืองเรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ส่วนกลีบดอกสีชมพูปลายเข้ม โคนกลีบดอกสีชมพูอมขาว เส้นกลีบเลี้ยง และกลีบดอกมองเห็นชัดเจนเรียงขนาดใกล้เคียงกัน

พันธุ์ที่ 6 มีชื่อว่า บัวเข็มขาว บัวปักกิ่งขาว หรือ บัวหลวงจีนขาว ดอกสีขาวรูปไข่ คล้ายกับพันธุ์บัวหลวงขาว แต่ดอกมีขนาดเล็กกว่า กลีบเลี้ยงขาวอมชมพู กลีบดอกขาวตลอดเรียงซ้อนกัน 3 ชั้น กลีบด้านนอก และด้านกลางมีขนาดใหญ่กว่ากลีบด้านใน

ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (เสริมลาภ วสุวัต.2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Nelumbo nucifera* Gaertn.
ชื่อสามัญ	HINDU LOTUS
ชื่อวงศ์	NYMPHAEACEAE
ชื่อไทย	บุณฑริก ปุณฑริก บัวหลวงขาว บัวแหลมขาว

ลักษณะทั่วไป (วาสนา มิตรานนท์.2527)

ลำต้น ลำต้นอยู่ใต้ดินใต้น้ำเรียกว่าเหง้า อยู่ในดินลึกประมาณ 5-15 เซนติเมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาวหรือค่อนข้างแดงมีจุดประปราย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีจุดสีน้ำตาล ปล้องรูปทรงกระบอกยาว 3.0-4.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 -3.60 เซนติเมตร ตรงข้อมีตา ที่ให้กำเนิดใบและดอก ส่วนล่างมีรากในลำต้นมีน้ำยางสีขาวขุ่น

ราก เป็นแบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้นรากอ่อนมีสีขาว และหมวกรากใหญ่เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อตั้งตรงชูขึ้นเหนือน้ำโดยอยู่ที่ผิวน้ำและชูใบเหนือน้ำหลายระดับ ใบมีรูปร่างเกือบกลม(suborbicular) เป็นแบบ peltate leaf มีส่วนที่เว้าเข้ามาตรงข้ามกันที่ขอบใบ 2 ตำแหน่ง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ palmately venation ก้านใบแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายและจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านใบ โดยทั่วไปก้านใบมีสีเขียวแต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำจะมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาวเมื่อถูกกับอากาศแล้วจะเหนียวเป็นเส้นก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่างของใบ

ดอก เป็นดอกขนาดใหญ่สีขาว สมบรูณ์เพศมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ดอกออกตรงข้อของลำต้นใต้ดินคู่กับใบแล้วส่งดอกขึ้นมาอยู่เหนือน้ำ ดอกมีขนาดใหญ่ ขณะที่ดอกตูมจะมีลักษณะรูปไข่ปลายเรียว เมื่อบานมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13-18.5 เซนติเมตร กลีบดอกมี 4-5 กลีบเรียงตัวเป็น 2 ชั้น สับหว่างกัน ด้านนอกของกลีบมีสีขาวปนเขียว ส่วนด้านล่างมีสีจางลง เส้นบนกลีบมีขนาดใกล้เคียงกันและมีจำนวนมากแต่ไม่นูนเด่นชัด กลีบนอกมีรูปร่างโค้งป้องตรงกลางกลีบในมี 12-14 กลีบ เรียงตัวเป็นชั้น ประมาณ 8 ชั้น โดยรอบของฐานรองดอก กลีบชั้นนอกและชั้นในมีขนาดเล็กกว่าชั้นกลาง ด้านนอกของกลีบจะมีสีเหลืองปนเขียว ด้านในมีสีอ่อนกว่าเห็นเส้นบนกลีบมีสีขาวและมีขนาดใกล้เคียงกันเป็นจำนวนมาก ชั้นที่อยู่ตรงกลางจะมีขนาดใหญ่สุด มีรูปร่างรูปไข่แต่ส่วนกว้างอยู่ตอนบน (obovate) เห็นเส้นบนกลีบในชัดเจนประมาณ 5 เส้น มีสีขาวนวลโดยตลอด ทั้งด้านนอกและด้านในยกเว้นส่วนที่ติดกับฐานรองดอกมีสีเหลือง เกสรตัวผู้มี 90-117 อัน อยู่เหนือกลีบชั้นใน ก้านเกสรตัวผู้เรียวเล็ก มีสีเหลืองนวลตอนบนมีอับเรณูสีเหลืองสด ติดตามความยาวของแกนเหนืออับเรณูขึ้นไปมีส่วนปลายสีขาวขุ่น รูปร่างเรียวเล็กที่ฐานและใหญ่ที่ส่วนปลาย ความยาวของส่วนปลาย 0.25-0.30 เซนติเมตร เกสรตัวผู้มีกลิ่นหอม เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่สูงกว่าเกสรตัวผู้ มีสีเหลืองนวล มีผนังหนาฝังอยู่ส่วนบนของฐานรองดอกมีลักษณะรูปกรวยและมีสีเหลือง ก้านชูเกสรตัวเมียสั้น ยอดเกสรตัวเมียกลมแบน สีเหลืองเป็นมันแข็ง ในดอกหนึ่งจะมี carpel 15-30 อันและกระจายไม่ติดกัน ภายในแต่ละรังไข่จะมีไข่อยู่ 1 อัน (จารีย์ หอยทอง.2519) ก้านดอกแข็งเหมือนก้านใบ คือ ก้านดอกแข็งมีหนามสั้นๆ ขนาดเล็กสีน้ำตาลประปรายจำนวนของหนามลดน้อยลงในตอนโคนก้านดอก โดยทั่วไปก้านดอกมีสีเขียว แต่ส่วนที่อยู่ใต้น้ำมีสีจางลง ในก้านใบมีน้ำยางสีขาว เมื่อถูกอากาศจะเหนียวเป็นเส้น

กลีบเลี้ยง ลักษณะเป็นรูปไข่รี เหี่ยวและร่วงง่ายแต่บางครั้งก็อยู่จนติดเป็นผล กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปร่างคล้ายกันมากแยกจากกันได้ยาก กลีบเลี้ยงจะมีสีขาวอมเขียว

ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) มักเรียกกันว่าฝักประกอบด้วยผลย่อยๆ เมื่ออ่อนเปลือกหนาสีเขียว ด้านในสีขาวพอแก่เปลี่ยนเป็นสีดำและแข็ง ผลอ่อนแต่ละผลเป็นแบบ nut มักเรียกกันว่าเมล็ดบัว

เมล็ด มีเปลือกหุ้มบางสีขาว อ่อนนุ่มภายในมีใบเลี้ยงหนามีสีขาวนวล 2 ใบ ไม่มี endosperm (exalbuminous seed) ต้นอ่อนมักมีสีเขียวเข้มเรียกกันว่า ดีบัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขยายพันธุ์บัวหลวง

1. การปลูกด้วยหน่อและหัว หน่อและหัวที่ตาและต้นเริ่มผลิ ให้วางตาหน่อตามแนวนอนให้ส่วนตาอยู่ด้านบน ถ้าปลูกโดยหัวให้ส่วนยอดของหัวขึ้นด้านบน กลบด้วยดินหนาประมาณ 1 นิ้ว ถ้าเป็นดินร่วนควรใช้ก้อนหินแบนๆ ทับด้านบนของดิน โดยอย่าทับส่วนของตา เติมน้ำให้สูงกว่าระดับหน้าดิน ประมาณ 2-3 นิ้ว แล้วนำภาชนะไปวางในที่ได้รับแสงแดดเต็มที่

2. การปลูกด้วยเมล็ด ใส่ดินหนาประมาณ 1-2 นิ้ว โรยเมล็ดเป็นแถวให้ห่างแถวละประมาณ 1 นิ้ว ลบด้วยดินร่วนละเอียดหนา 5 เซนติเมตร แล้วค่อยๆ พ่นน้ำฝอยจนดินอุ้มน้ำเต็มที่ ปล่อยทิ้งไว้ 1-2 วัน กดปิดหน้าดินให้แน่นพอสมควร นำภาชนะไปแช่น้ำในอ่างให้ผิวหน้าดินอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำ ½ นิ้ว

3. การปลูกด้วยเหง้า เหง้าเป็นส่วนของลำต้นที่อยู่ใต้ผิวดิน มีการสะสมอาหาร หลังจากนั้นตาก็จะมีการแตดหน่อเป็นต้นอ่อน เจริญขึ้นมาให้ตัดต้นอ่อนโดยมีส่วนของเหง้าติดไป 2-3 นิ้ว นำไปปลูก (สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2533.)

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส(Callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา(parenchyma) ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ เซลล์มีขนาดต่างๆ มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอ(vacuole) จำนวนมาก ลักษณะแคลลัสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แคลลัสชนิดที่เซลล์เกาะกันอยู่หลวมๆ แยกจากกันได้ง่าย เรียกว่า friable callus หรือ soft callus และอีกชนิดคือแคลลัสที่เกาะกันแน่น แยกออกจากกันได้ยาก เรียกว่า compact callus หรือ hard callus (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540) ทุกส่วนที่มีชีวิตของพืชสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ส่วนที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในพืชใบเลี้ยงคู่คือ คัพภะ (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon) ลำต้น (stem) ส่วนเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ส่วนใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และราก (root) ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ คัพภะ ใบอ่อน (young leaf) ดอกอ่อน (young flower) และเมล็ดที่เพิ่งเริ่มงอก นอกจากนี้เนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้ (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536;รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540)

1.ขนาดและรูป (size and shape) ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงแม้ไม่มีข้อจำกัดหรือข้อวิกฤต แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป

2.สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนินซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้ โดยทั่วๆไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับความเข้มข้นของออกซินที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนินที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากจะต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักทั่ว ๆ ไป ของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามิน (glutamine) แอสปาราจีน (asparagine) อาร์จินิน (arginine) พิวรีน (purine) และไพริมิดิน (pyrimidine) สารพวกเคซินไฮโดรไลเซท สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) ยีสต์ (yeast extract) และน้ำมะพร้าว (coconut milk) มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย

4. แหล่งคาร์บอน (cabon source) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) และน้ำตาลแซคคาโรส (saccarose) ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

5.ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

6.สภาพอาหาร(media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งมักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

การถ่ายยีนในพืช

การถ่ายยีนในพืชทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งได้รับรองการถ่ายยีนมีความก้าวหน้าไปมาก สามารถเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ลำต้น กิ่ง ดอก อับเรณู จนถึงกลุ่มเซลล์ และโปรโตพลาสต์ จนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบรูณ์ได้ การสร้างพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) หรือการศึกษาการแสดงออกของยีนใดๆ ในพืชจึงไม่ใช่สิ่งที่เป็นไปไม่ได้อีกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ประการแรก ได้แก่ ความต้องการนำยีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์เข้าสู่โครโมโซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพืชที่มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกร และผู้บริโภค ทั้งพืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ ประการที่สอง เพื่อการศึกษาให้เกิดความเข้าใจในกลไกหรือการทำงานของยีน (gene function) หรือกระบวนการต่างๆ ในทางชีววิทยา (biological process) โดยเมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้ว และยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืช ก็จะสามารถอธิบาย หรือแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีน หรือกระบวนการที่เกิดขึ้นในพืชได้ระดับหนึ่ง ทั้งนี้รวมถึงการศึกษาในด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ดินด้วย (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ,ม.ป.ป.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

1. โคลนยีนศึกษารายละเอียดของยีนที่ต้องการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (gene cloning and identification) และจัดทำพลาสมิดสำหรับถ่ายยีน

2. พัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชให้เป็นต้นพืช (plant regeneration) ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ถ่ายยีนแล้วให้เป็นต้นพืช

3. ถ่ายยีน หรือ DNA เข้าสู่โครโมโซมพืช (gene transfer to plant) ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับ explant (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ,ม.ป.ป.)

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Methods of plant transformation) มีเทคนิคในการถ่ายยีนหลายวิธีดั้งนี้

การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)

การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี การถ่ายฝากยีนวิธีนี้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ประกอบมากนัก การถ่ายยีนจะถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากพืชแล้วนำมาบ่มร่วมกันกับสารละลาย DNA ที่เตรียมไว้ นิยมใส่สารละลาย polyethylene glycol (PEG) ร่วมด้วย ให้มีความเข้มข้นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ กลไกการทำงานที่แท้จริงของ PEG ยังไม่ทราบ แต่สันนิษฐานว่า PEG จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง จึงมีโอกาสที่ DNA จากภายนอกจะเข้าไปภายในเซลล์ได้มากขึ้น ในการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ก็นิยมใช้สารละลาย PEG ร่วมกับการใช้ความร้อนระยะสั้นๆ อย่างทันทีทันใด (heat shock) โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลาย DNA และ PEG มาใส่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายมาใส่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 วินาที (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล.2543)

การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporetion) เป็นวิธีการที่ใช้ทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้กระแสไฟฟ้านำมาประยุกต์ใช้ในการถ่ายยีนในพืช โดยนำโปรโตพลาสต์มาบ่มรวมกับสารละลาย DNA แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปเพื่อทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ และ DNA มีโอกาสแทรกเข้าสู่เซลล์ทางช่องเปิดนั้น ในสารละลายอาจจะมีสาร PEG ด้วยก็ได้ กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าต่ำ ระยะเวลานาน (long pulse) และระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าสูงกว่า แต่ใช้เวลาสั้น (short pulse) ทั้งนี้ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ใช้และเวลา ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรโตพลาสต์ การทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์นี้นอกจากจะใช้กระแสไฟฟ้าธรรมดาอาจจะใช้แสงเลเซอร์ โดยแสงเลเซอร์สามารถทะลุผ่านผนังเซลล์ได้ ดังนั้นส่วนของพืชที่นำมาใช้อาจจะใช้กับโปรโตพลาสต์ หรือเซลล์ที่อยู่ในสภาพแคลลัสก็ได้ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543)

การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection) วิธีการนี้ทำได้โดยใช้โปรโตพลาสต์ที่ได้จากเซลล์ใดก็ได้ แล้วฉีด DNA เข้าไป พืชมีแวคิวโอลซึ่งเป็นที่เก็บเอนไซม์ และสารพิษหลายชนิด การฉีดจึงต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกแวคิวโอลแตก เพราะมักจะทำให้เซลล์ตาย บางครั้งพบว่านิวเคลียสซ่อนอยู่หลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แวคิวโอล ทำให้ไม่สามารถฉีด DNA เข้าไปได้ วิธีแก้ปัญหา คือ เลือกเซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่ริมขอบเซลล์ใน ทิศทางของเข็มที่ใช้ฉีด แต่เซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่ขอบเซลล์มักจะไม่แข็งแรง อีกทางหนึ่ง คือ ทำให้เซลล์เกาะติดอยู่กับที่เพื่อสะดวกในการฉีดโดยมี micromanipulator หรือ holding pipette ดูดเซลล์ไว้ หรือทำให้เซลล์เกาะติดกับแก้วโดยเคลือบแก้วด้วยสาร poly L lysine หรือ ใช้วิธีฝังโปรโตพลาสต์ไว้ในอะกาโรสแล้วจึงเลือกฉีด DNA เข้าสู่โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543)

การถ่ายยีนโดยเครื่องยิง (particle gun หรือ microprojectile bombardment หรือ biolistic technique) วิธีนี้จะใช้อนุภาคทังสเตน หรือทองขนาดเล็กประมาณ 1-4 ไมครอน เคลือบด้วย DNA ที่ต้องการถ่ายเข้าเซลล์แล้วใส่ลงในเครื่องยิงกระสุนเคลือบ DNA นั้นเข้าสู่เซลล์ประมาณ 1,400 ฟุตต่อวินาที ด้วยความเร็วดังกล่าวนี้ อนุภาคที่ใช้จะแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายใน และพาเอา DNA หรือ RNA เข้าไปด้วย วิธีนี้ทำได้ง่ายกว่าวิธีฉีดเพราะครั้งหนึ่ง ๆ สามารถยิงอนุภาคเข้าไปได้เป็นพันอนุภาค ใช้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์โดยไม่ต้องทำเป็นโปรดตพลาสต์ นอกจากนี้ยังใช้ถ่ายยีนไปที่ออร์แกเนลล์ได้ด้วย เช่น ถ่ายยีนไปที่ไมโตคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543)

การส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อาศัยอยู่ในดิน ชนิดที่นิยมใช้ในการถ่ายยีน คือ *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรค crow gall ที่เกิดในพืชใบเลี้ยงคู่ อาการของโรคคือ ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม ในลักษณะของเนื้องอกที่ลำต้นใกล้รอยต่อกับผิวดิน สาเหตุของการเกิดปุ่มปมนี้เนื่องจากมีการถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน auxin และ cytocynin ไปพร้อมกับยีนอื่นๆ จากแบคทีเรียเข้าไปรวมตัวกับโครโมโซมของพืช ทำให้เซลล์บริเวณที่ติดเชื้อสามารถสังเคราะห์ auxin และ cytocynin ได้เอง โดยปราศจากกลไกการควบคุม เซลล์จึงแบ่งตัวแบบผิดปกติ และเกิดเป็นก้อนขึ้น นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาถึงกลไกการถ่ายยีนเหล่านี้ และพบว่าสามารถตัดยีนต่างๆ ที่เกี่ยวกับการเกิดโรคออก แล้วใส่ยีนใหม่ที่เป็นประโยชน์เข้าไปแทน เมื่อพืชถูก infect ด้วยเชื้อนี้ ยีนที่เป็นประโยชน์เหล่านั้นก็ถูกถ่ายเข้าสู่พืช จึงเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนให้แก่พืช (สนธิชัย จันทร์เปรม.2543)

พลาสมิดใน *Agrobacterium*

Agrobacterium จะมีพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140-235 กิโลเบส เรียกพลาสมิดนี้ว่า Tumor inducing plasmid หรือ Ti plasmid *Agrobacterium* ที่พบพลาสมิดนี้ คือ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิด Ti จะทำให้พืชเกิดลักษณะปุ่มปมหลังได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผล เกิดจากการเจริญอย่างรวดเร็วของเซลล์คอร์เทกซ์ และเมื่อ *Agrobacterium* บุกรุกเข้าไปในพืชจะมี DNA บางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายทอด และแทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียก DNA นี้ว่า T(transferred) DNA ยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วน T-DNA มีบทบาททำให้พืชสร้างโอปีนโดยมีเอนไซม์ที่เกียวข้อง คือ ออกโทปีนดีไฮโดรจีเนส (ocopine dehydrogenase) และโนปารีนดีไฮโดรจีเนส (nopaline dehydrogenase) ที่ถูกกำหนดโดยยีนบนส่วน T-DNA ซึ่งเป็นส่วนที่มีผลกระตุ้นทำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัว และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มปม (ปรีชา ประเทพา. 2543)

กลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีน *Vir* ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วยยีนตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้

Vir A มีหน้าที่เกี่ยวการควบคุม โดยจดจำสารประกอบพวก phenolic ซึ่งผลิตจากพืชและไปกระตุ้นยีน *Vir* G

Vir G มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมเช่นกัน โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่นๆ ในกลุ่ม

Vir D จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของ DNA ที่จุดขอบเขตทางขวาและซ้ายของ T-DNA คือ RB และ LB ทำให้เกิด T-DNA สายเดี่ยว (T-stand) สำหรับส่งไปยังเซลล์พืช

Vir C เกี่ยวข้องกับการกำหนดสารพันธุ์ของแบคทีเรีย และชนิดของพืชที่จะเข้าบุกรุก (host rang determination) แต่ยังไม่ทราบว่ามีวิธีการอย่างไร

Vir E เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับ DNA สายเดี่ยว เพื่อให้ T-DNA มีความคงตัวในระหว่างและหลังจากมีการส่งถ่ายยีน

ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium*

ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ การเลือกใช้เนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีการตอบสนองต่อการส่งถ่ายยีนสูง การปรับสภาวะของการส่งถ่ายยีนให้เหมาะสมต่อการบุกรุกของ *Agrobacterium* เช่น การเติมสารประกอบฟีนอล เช่นเดียวกับสารที่เซลล์พืชปล่อยออกมาขณะเกิดบาดแผล การใช้ยีนควบคุมการแสดงออกที่มีประสิทธิภาพกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมถึงการเลือกใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ที่เหมาะสม การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชโดยอาศัย *A.tumefaciens* ทำได้โดยโพรโตพลาสต์ (protoplast) หรือ ใช้ส่วนต่างๆ ของพืช (explant inoculation) โดยพืชที่ถูกเลี้ยงกับแบคทีเรียในเวลาสั้นๆ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่กระตุ้นให้เกิดแคลลัส จากนั้นจึงชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นในอาหารที่เหมาะสม (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536) ประกอบที่มี pH ประมาณ 5.0-5.8 และมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น phenolic compound ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ lignin และ flavonoid สาร phenolic compound มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *vir* ได้แก่ acetosyringone และ alpha-hydroxyacetosyringone ซึ่งพบมากในเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล (Stahcel *et al*., 1985) มีรายงานการศึกษาถึงผลของสารเคมี acetosyringone ซึ่งเป็นสารที่หลั่งจากบาดแผลของพืชเป็นเวลา 8-16 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ที่อยู่บน Ti plasmid ได้ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้มีการสร้างเอนไซม์ endonuclease ออกมาตัดชิ้นส่วน T-DNA เพื่อเข้าไปเชื่อมต่อกับโครโมโซมของเซลล์พืช (Hooykass *et al.*, 1984)

ยีนรายงานผลและยีนเครื่องหมายที่ใช้ในพืช

พลาสมิด Ti ประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย (maker gene) และยีนรายงานผล (reportor gene) ที่มีข้อแตกต่างกัน คือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะบางประการในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนโดยการถ่ายฝาก ทำให้สามารถแยกออกโดยง่ายเพื่อใช้ตรวจสอบผลของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่ใช้ในการกำหนดลักษณะที่ทำให้ทราบว่าส่วนของ โปรโมเตอร์ที่ต่อกับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และสามารถแสดงออกได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใดในพืช ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลอาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบว่าทำงานได้ตลอดเวลาในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผล ก็จะต่ออยู่กับส่วนของ DNA ที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens*

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* จำเป็นต้องมีการศึกษาอิทธิพลของยาปฏิชีวนะที่มีต่อพืช เนื่องจากยีนต้านทานยาปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก ซึ่งมีหน้าที่ในการช่วยคัดเลือกพืช ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนในระยะแรก เพื่อให้เซลล์พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นขึ้นมาได้ ภายในสภาวะที่แตกต่างไปจากสภาวะปกติ ในขณะที่เซลล์พืชที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนเข้าไป ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะนั้น การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชนั้นเป็นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชแต่ละเซลล์ ที่อยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน หรือได้รับสารพันธุกรรมนั้น จะเริ่มต้นกันตั้งแต่ระดับเซลล์ เซลล์ใดที่ได้รับการส่งถ่ายยีนอย่างครบถ้วนจะถูกคัดเลือกไว้ และได้รับการเลี้ยงดูอย่างเหมาะสม จนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งการคัดเลือกเซลล์พืชดังกล่าวนี้จะอาศัยลักษณะการแสดงออก โดยการควบคุมของยีนเครื่องหมายคัดเลือกเป็นตัวบ่งชี้ (บุญญานารถ นาถวงษ์. 2545)

ยาปฏิชีวนะ kanamycin สร้างมาจากเชื้อ *Streptomycin kanamyceticus* เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides มีสมบัติจับกับ 30 S subunit ของไรโบโซม (ribosome) ส่งผลยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (transcription) และลอกรหัส (translation) เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin จะแสดงอาการใบเหลืองซีด เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ได้

Cefotaxine เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporin group) มีสมบัติในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียรูปแท่ง (rod - shaped) แกรมลบ (gram negative) ในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาปฏิชีวนะ cefotaxine ต้องคำนึงถึงระดับความเข้มข้นที่ใช้ เนื่องจาก cefotaxine มีความเข้มข้นสูงจะสามารถกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ได้หมด แต่อาจส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ได้ จึงได้ทำการทดสอบอิทธิพลของยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญเติบโตของพืช เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของ cefotaxine ที่เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญได้ (ประวีณา มณีรัตนรุ่งโรจน์ และคณะ.2544)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รองรอง หอมหวล (2541) ศึกษาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) พันธุ์ Carl Red โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ ซึ่งมีพลาสมิด A281/pBI121 ที่มียีน GUS เป็น ยีนรายงานผล และมี kanamycin เป็นสารคัดเลือก มียีน *NPT II* เป็นยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จากการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแคลลัสทั้งหมด เมื่อนำแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin เหล่านี้มาทดสอบ GUS activity พบจุดสีน้ำเงินบนก้อนแคลลัสและภายในเซลล์ จากนั้นนำ transformed calli เหล่านี้ไปตรวจสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อยืนยันในระดับ DNA หลังจากตรวจสอบด้วย gel electrophoresis แล้วพบ band ที่แสดง GUS gene ที่ระดับ 1.2 kb และ band ที่แสดงยีน *NPT II* ที่ระดับ 0.7 kb ใน transgenic calli ที่ตรวจสอบ

ประสิทธิ ศรีอริยะวงศ์ และ พงศธร กิมเฮง (2542) ศึกษาการย้ายยีนในข้าวโพด โดยใช้ *Agrobacterium* พบว่า ปัจจัยการย้ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 เอ็มบริโอที่เลี้ยง 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย acetocyringone 100 ไมโครโมลาร์ และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จะมีเปอร์เซ็นต์ย้ายยีนมากที่สุด

ฐิติมา วงษ์การค้า และ สุภาลัย ไชยสุต (2544) ศึกษาการย้ายยีนในหญ้า โดยใช้ *Agrobacterium* พบว่าเปอร์เซ็นต์การย้ายยีนที่ดีที่สุดเมื่อใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ชิ้นส่วนที่เป็นข้อปล้อง และเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4- D 3 mg/l และ acetocyringone 50 ไมโครโมลาร์

เทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ และ ธำรง เงาภู่ทอง (2544) ศึกษาการย้ายยีนในข้าวเหนียวโดยใช้ *Agrobacterium* พบว่าปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวเหนียวดำ คือ เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของacetocyringone 100 ไมโครโมลาร์ และอายุของแคลลัส 5 วัน และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวเหนียวสันป่าตอง อายุแคลลัส 10 สัปดาห์ คือ เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 และความเข้มข้นของacetocyringone 100 ไมโครโมลาร์

Paiva *et al.* (1997) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล็อกซิเนีย โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashinge and Skoog, 1962) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับต่างๆ ได้แก่ BAP 0, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0, 0.1, หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, หรือ 1.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0, 0.1, หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 0, 0.5, 1.0, 2.0, หรือ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0, 0.1, และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า TDZ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0 หรือ 0.1 มิลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการชักนำแคลลัสกล็อกซิเนีย

Hiei and Komari (1997) ได้ทดลองย้ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวจาปอนิคา 3 สายพันธุ์ คือ Tsukinchikari Asanohikari และ Koshihikari โดยศึกษาผลของสภาวะในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวคเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับเนื้อเยื่อพืช คือ การเลี้ยงในอาหารมี acetocyringone ที่อุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส หากไม่เลี้ยงในสภาวะดังกล่าวจะทำให้การย้ายยีนไม่ประสบผลสำเร็จ

Albarran (1998) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของต้นมะฮอกกานี (*Swietenia maerophylla.*) ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยศึกษาสูตรอาหารพื้นฐาน สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มแสง และระยะเวลาการให้แสง พบว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนข้อ กลีบดอก และใบเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร ½ MS (Murashinge and Skoog, 1962) ที่เติม TDZ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 5 มิลิลกรัมต่อลิตร สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

Lutfor (2000) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์หญ้าญี่ปุ่น (*Zoysia japonica* Steud.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ *Agrobacterium* ที่ต่างสายพันธุ์ ความเข้มข้นของ acetocyringone ที่ต่างกัน พบว่า หลังจากพืชถูกถ่ายยีนไปแล้ว 24 ชั่วโมง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (plG121) สามารถตรวจสอบยีน *GUS* ในหญ้าได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เหมาะในการเพาะเลี้ยงหลังจากมีการย้ายยีนของ *Agrobacterium tumefaciens* ควรมีส่วนประกอบของ acetocyringone 50 ไมโครโมลาร์

Kim and Kim (2000) การถ่ายยีนในผักกาด *Lactuca sativa* ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะโดยถ่ายยีน *AmA1* เพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบด่าง โดยใช้ส่วนของยอดเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashinge and Skoog, 1962) ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร รากขึ้นดีในอาหาร MS ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 250มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำพืชที่ถ่ายยีนแล้วไปตรวจสอบยีน *AmA1* ด้วยวิธี PCR เพื่อยืนยันในระดับ DNA

Dipali (2001) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 0.05 0.01 0.05 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงส่วน hypocotyl ของต้น cumin (*C. cyminum*) พบว่า เกิดแคลลัสสีเขียว แบบ compact ในทุกระดับความเข้มข้นของ TDZ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supuk *et al.*(2005) ศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิงค์ใช้ส่วนของ retarded shoots โดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* AGLO ที่มีเวคเตอร์ pBI121 or pBI121-*Ca-ACSI* เลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหาร MS (Murashinge and Skoog, 1962) ที่ประกอบไปด้วย IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, IMA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร, TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ vancomycin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 อาทิตย์ เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าเกิดตายอดเล็กๆ ขึ้นบนอาหาร MS ที่เติม kanamycin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเป็น MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 อาทิตย์ ใช้วิธี PCR ทดสอบ และพบว่ามีชิ้นส่วนมากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถถ่ายยีนได้สำเร็จ

Xiaomei and Paula (2006) ศึกษาการถ่ายยีนในแบล็คเชอร์รี่ (*Prunus serotina* Ehrh.) ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะโดยการถ่ายยีน *AGAMOUS* เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยใช้ส่วนของใบแบล็คเชอร์รี่ คัดเลือกเซลล์และยอดโดยใช้เวลา 12 สัปดาห์ โดยเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่เติม kanamycin เป็นสารคัดเลือก ยอดใหม่สามารถเจริญได้ดีในอาหาร WPM ที่เติม TDZ 9.1 ไมโครโมลาร์, NAA 1.1 ไมโครโมลาร์ และ kanamycin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่เติม Timentin 300 มิลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งการถ่ายยีน *AGAMOUS* สามารถทำได้สำเร็จ ตรวจสอบยีนโดยใช้วิธี PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1 ชิ้นส่วนเริ่มต้น

1.1.1 เมล็ดบัวพันธุ์บุณฑริก (ภาพที่1)

1.2 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 (pBI121 DFR) (ภาพที่2)

1. 3 สารเคมี

1.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็ง และเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1)

1.3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

- TDZ (1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)- urea)
- NAA (α-Naphthaleneacetic acid)

1.3.3 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ

- เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (clorox)
- ทวีน 20 (polyoxyethylene sorbitan)

1.3.4 สารปฏิชีวนะ

- Kanamycin
- Cefotaxine

1.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

1.4.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และแบบหยาบสำหรับชั่งสารเคมี

1.4.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.4.3 อุปกรณ์ เครื่องมือสำหรับย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อหรือตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar flow) ปากคีบที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด จานแก้ว (petri disc)

1.4.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

1.4.5 เตาแก๊ส

1.4.6 ตู้ไมโครเวฟ

1.4.7 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว ได้แก่ กรวย กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต จานแก้ว (petri disc) ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.8 ปิเปตอัตโนมัติ (autopipett) tip ขนาด 1000 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร

1.4.9 กล้องดิจิตอล และกล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.4.10 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส แสงจากหลอด cool white 16 ชั่วโมงต่อวัน ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ

1.4.11 อุปกรณ์ และเครื่องมืออื่นๆ ได้แก่ ปากกา ดินสอ สมุดบันทึก ถุงพลาสติก ยางรัด กระดาษกราฟ และนาฬิกา

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมชิ้นส่วน

การฟอกฆ่าเชื้อ

นำเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที จากนั้นนำเมล็ดบัวฟอกด้วยคลอรอกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ ทวีน 20 2 หยด เขย่านาน 20 นาที จากนั้นนำเมล็ดบัวล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ล้าง 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที แล้วนำเมล็ดบัวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเตรียมที่จะตัดชิ้นส่วนบริเวณตายอดของเอมบริโอเพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีน

2.2 วิธีการเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหาร Yeast extract –Malt extract medium (YM)

เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBI121 DFR ในอาหาร YM (ตารางภาคผนวกที่ 2) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงไว้ประมาณ 2 - 3 วันแล้วนำมาโคโลนีเดี่ยวจากนั้นเลี้ยงในอาหาร YM Broth ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วัน เขย่าที่ 250 rpm วัดค่า OD_{600} ประมาณ 0.6 - 0.7 จึงนำเชื้อมาปั่นตกตะกอน ที่ 6000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นเทอาหารเก่าออกให้เหลือแต่ตะกอนเชื้อ ทำการเติมอาหาร MS เหลว หลอดละ 10 มิลลิลิตร ต่อหลอดเชื้อ Agrobacterium ทำการละลายเชื้อให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม Acetocyringone 100 ไมโครโมลาร์

2.3 การถ่ายยีนเข้าสู่ตายอดของเอ็มบริโอบัวหลวงโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 (pBI121 DFR)

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดส่วนตายอดของเอ็มบริโอ จากนั้นนำส่วนของตายอดจากเอมบริโอ มาแช่ในอาหารทั้ง 5 treatment โดยแต่ละ treatment มี 5 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

วิธีการที่ 1 = Control +(เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin)

วิธีการที่ 2 = Control - (เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin)

วิธีการที่ 3 = *A. tumefaciens* AGL1 (pBI121 DFR) ความเข้มข้น 1:10 , แช่นาน 10 นาที

วิธีการที่ 4 = *A. tumefaciens* AGL1 (pBI121 DFR) ความเข้มข้น 1:10 , แช่นาน 30 นาที

วิธีการที่ 5 = *A. tumefaciens* AGL1 (pBI121 DFR) ความเข้มข้น 1:20 , แช่นาน 30 นาที

นำชิ้นส่วนแต่ละวิธีการ ไปซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววางบนอาหาร (MS + Acetocyringone 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ละวิธีการๆ ละ 5 ชิ้นส่วน เลี้ยงไว้ 2 วัน แล้วนำชิ้นส่วนมาล้างในอาหารเหลวสูตร MS + Cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำชิ้นส่วนแต่ละวิธีการ ไปซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อ นำเนื้อเยื่อ วิธีการที่1เลี้ยงบนอาหาร (MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ และวิธีการที่ 2-5 เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์+ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร+ Cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมและเลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเป็นสูตร (MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ + kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการเปลี่ยนอาหารสูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์จนถึงสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหาร MS อีก 8 สัปดาห์

การบันทึกข้อมูล

การทดลองบันทึกผลทุก 2 สัปดาห์ ดังนี้

1. ขนาดของชิ้นส่วน

2. บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน ตายอดเอ็มบริโอของหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (ภาพที่ 3)

คะแนน 1 ชิ้นส่วนดำหรือชิ้นส่วนตาย (a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง ขาวหรือน้ำตาล แสดงอาการเริ่มตาย (b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนคงสภาพเดิม มีสีเขียวอ่อน (c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนมี สีเขียวเข้ม (d)

คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีสีเขียวเข้ม และมีลักษณะที่เจริญที่ดี (e)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
109036

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New's Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

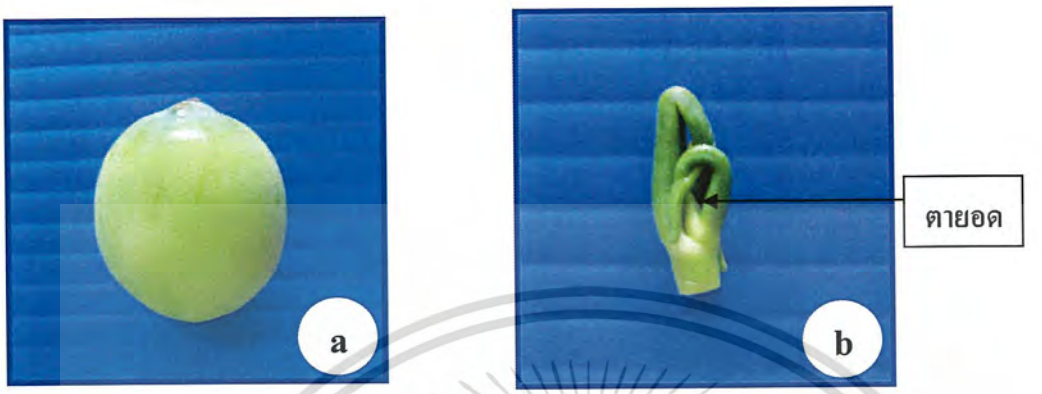
สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

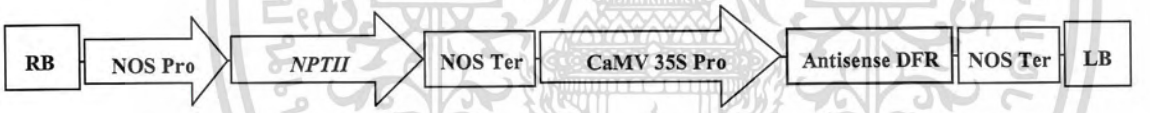
ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มการทดลอง	มกราคม	2552
สิ้นสุดการทดลอง	เมษายน	2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

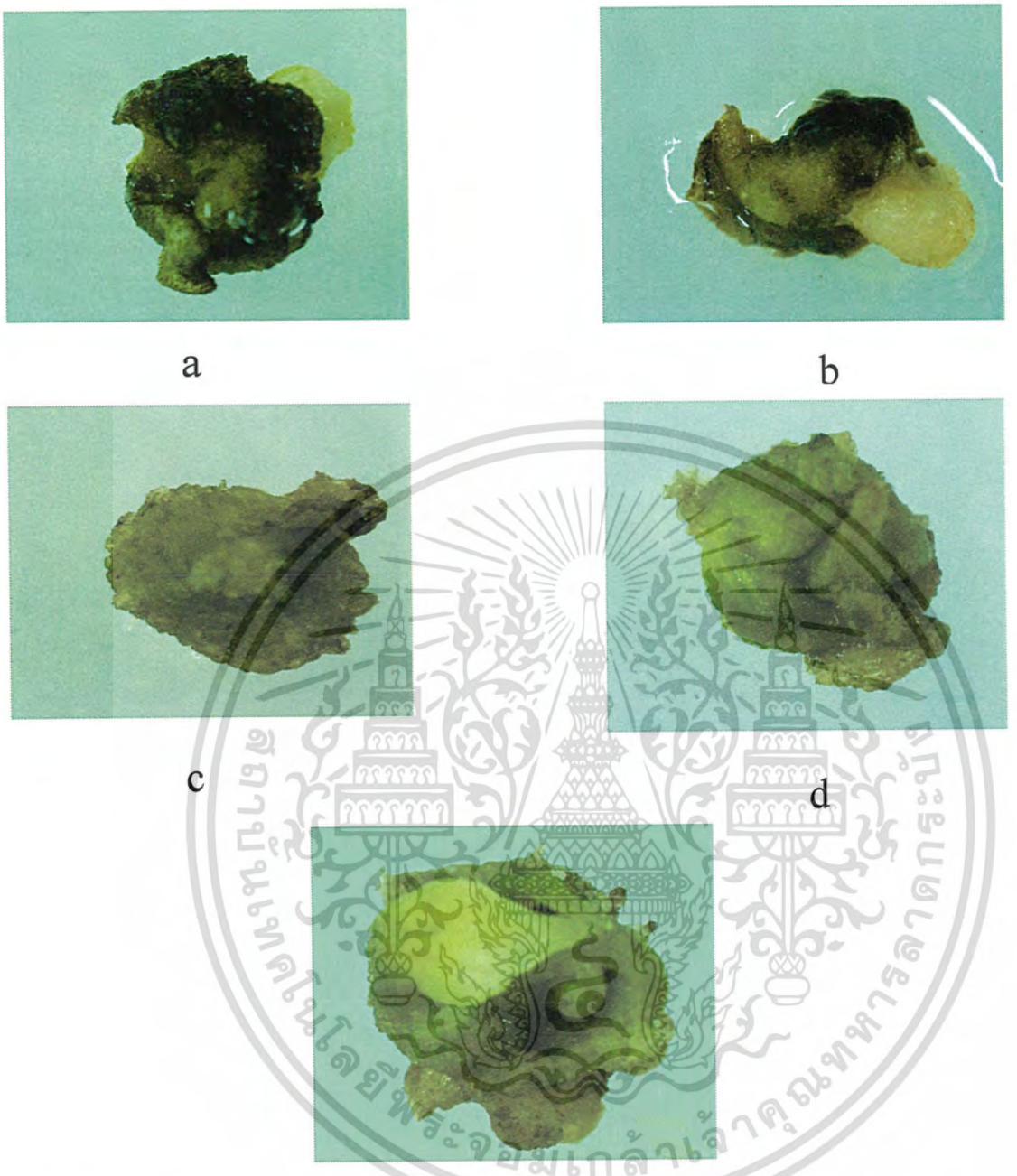


ภาพที่ 1 เมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แสดงลักษณะเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก(a)และตายอดจากเอมบริโอ (b) ที่ต้องการ



ภาพที่ 2 พลาสมิด pBI121 DFR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอหลังได้รับการถ่ายยีนที่มีพลาสมิด pBI121DFR ที่ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน
b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน
c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน
d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน
e แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การศึกษาความเข้มข้มของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBI121DFR สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อส่วนตายอดจากเอมบริโอ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 วิธีการ วิธีการละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้น โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดของเอมบริโอบนอาหารคัดเลือก (MS + NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ + kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร+ cefotoxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร)

การเจริญเติบโตและขนาดชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBI121 DFR ที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ ที่มีความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และระยะเวลาในการบ่มเชื้อร่วมกับเนื้อเยื่อในระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำมาคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ + TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ + kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร + cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 เนื้อเยื่อในวิธีการที่ 1 (Control + เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน) และเนื้อเยื่อในวิธีการที่ 2 (Control – เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก) ถึงวิธีการที่ 5 มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ ในวิธีการที่ 1 เป็นวิธีการเดียวที่ไม่ได้เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกจึงมีการเจริญเติบโตที่เป็นปกติ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการที่ 2 ถึงวิธีการที่ 5 ส่วนวิธีการที่ 2(Control – เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน) ถึงวิธีการที่ 5 ที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน ในสัปดาห์ที่ 4 เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนตามวิธีการที่3,4 และ5 เชื้อ (*Agrobacterium* ต่อ MS ใน 1:10 แช่นาน 10 นาที , 1:10 แช่นาน 30 นาที และ 1:20 แช่นาน 30 นาที) มีการเจริญเติบโตที่เท่ากัน คือ 0.30 ตารางเซนติเมตร ในสัปดาห์ 8ในวิธีการที่ 1 (Control + เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน) มีขนาดของตายอดจากเอมบริโอเจริญดีที่สุด คือ มีขนาด 0.73 ตารางเซนติเมตร เนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (Control -) ก็ยังตายไม่หมด แต่จะเห็นว่า วิธีการที่ 3, และ5 มีขนาดเนื้อเยื่อที่เจริญดีกว่าวิธีการที่2 เพราะในวิธีการที่ 3 และ5 มีการถ่ายยีนจึงทำให้เซลล์ที่ได้รับยีนสามารถเจริญอยู่ได้บนอาหารคัดเลือกดีกว่า และเมื่อนำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ไม่แตกต่างกัน แต่เริ่มมีความแตกต่างในสัปดาห์ที่ 14 เนื้อเยื่อจากวิธีการที่1 (Control +) มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (Control -) มีขนาดของเอมบริโอที่เจริญได้ดีกว่า วิธีการที่ 3, 4, 5 เนื่องจากในสัปดาห์สุดท้ายหลังการเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรMS เนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (Control -) ยังมีการเจริญเติบโตอยู่ และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS แล้วจึงมีการเจริญเติบโตต่อไปได้ (ตารางที่1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดเอมบริโอ (ตารางที่2) พบว่า ในสัปดาห์ที่4 เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่เติม kanamycin (Control + เนื้อเยื่อไม่ได้รับการถ่ายยีน) มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ดีคือ 4.00 คะแนน และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ โดยที่เนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (Control-) และเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนทุกวิธีการพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 8 ในวิธีการที่ 3 (1:10, 10นาที) มีคะแนนการเจริญเติบโตของตายอดจากเอมบริโอน้อยกว่า วิธีการที่2 (Control-) อาจเป็นเพราะว่า วิธีการที่ 3 และ 4 มีความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ จึงมีคะแนนการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าวิธีการที่2 (Control-) จากนั้นเมื่อนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ซึ่งเป็นสารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 10-16 พบว่า ในสัปดาห์ที่ 16 เนื้อเยื่อในทุกวิธีการไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ในวิธีการที่1 (Control+) มีคะแนนการเจริญเติบโตดีที่สุด (1.60 คะแนน) และวิธีการที่ 2 (Control-) และวิธีการที่ 5 (1:20, 30 นาที) มีคะแนนการเจริญเติบโตต่ำที่สุดคือ 1.00 คะแนน ในขณะที่วิธีการที่3 (1:10, 10 นาที) และวิธีการที่4 (1:10, 30 นาที) มีคะแนนดีที่สุด คือ 1.40 และ 1.20 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ของคะแนนไม่เป็นไปตามทิศทางเดียวกับขนาดของตายอดจากเอมบริโอ เนื่องจากขนาดที่ใหญ่ขึ้นมีบางส่วนที่มีสีน้ำตาลและคาดว่าเนื้อเยื่อที่มีสีน้ำตาลนั้นจะไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของตายอดจากเอมบริโอที่ได้รับการถ่ายยีนที่ระดับความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาต่างๆเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10 - 16

Tretment	ขนาดตายอดจากเอมบริโอ(ตารางเซนติเมตร)/อายุ(สัปดาห์)[1/]							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Control +	0.40±0.00[a]	0.40±0.08	0.62±0.02	0.73±0.05	0.99±0.09	0.94±0.14	1.21±0.13[a]	1.27±0.12
Control -	0.30±0.03[b]	0.26±0.02	0.50±0.03	0.64±0.05	0.57±0.05	0.66±0.08	0.71±0.07[b]	0.74±0.07
1:10 , 10 min	0.32±0.02[b]	0.30±0.00	0.58±0.01	0.67±0.04	0.70±0.14	0.52±0.05	0.62±0.04[b]	0.68±0.05
1:10 , 30 min	0.30±0.00[b]	0.30±0.03	0.54±0.04	0.55±0.14	0.56±0.17	0.49±0.21	0.51±0.22[b]	0.62±0.27
1:20 , 30 min	0.30±0.00[b]	0.30±0.00	0.55±0.03	0.71±0.03	0.48±0.13	0.65±0.17	0.69±0.19[b]	0.75±0.20
CV%	11.54	27.94	11.19	25.23	41.07	48.54	43.08	45.30

[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 คะแนนการเจริญเติบโตของตายอดจากเอมบริโอที่ได้รับการถ่ายยีนที่ระดับความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาต่างๆเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ในสัปดาห์ที่ 10 - 16

Tretment	คะแนนชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ /อายุ (สัปดาห์)[1/]							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Control +	2.40±0.24	4.00±0.32^{a}	4.40±0.40^{a}	4.80±0.20^{a}	3.00±0.32^{a}	1.60±0.40	1.60±0.40	1.60±0.40
Control -	3.20±0.49	2.40±0.24^{b}	2.40±0.24^{b}	2.20±0.37^{b}	1.20±0.20^{b}	1.20±0.20	1.60±0.24	1.00±0.00
1:10 , 10 min	3.4±0.81	3.60±0.24^{a}	3.00±0.32^{b}	1.80±0.20^{b}	1.00±0.00^{b}	1.00±0.00	1.00±0.00	1.40±0.24
1:10 , 30 min	3.80±0.58	3.60±0.40^{a}	2.20±0.20^{b}	1.60±0.40^{b}	1.60±0.40^{b}	1.20±0.49	1.00±0.45	1.20±0.49
1:20 , 30 min	2.60±0.24	3.00±0.45^{ab}	2.40±0.40^{b}	2.20±0.37^{b}	1.20±0.37^{b}	1.00±0.32	1.00±0.32	1.00±0.32
CV%	37.86	22.93	25.03	28.61	41.45	61.23	58.15	60.34

[1/]ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอร่วมกับการบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 (pBI121 DFR) ที่ระดับความเข้มข้นและช่วงเวลาในการบ่มต่างๆ กัน คือ ความเข้มข้นของเชื้อ 1:10 แช่นาน 10 นาที ความเข้มข้นของเชื้อ 1:10 แช่นาน 30 นาที และความเข้มข้นของเชื้อ 1:20 แช่นาน 30 นาที หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ และร่วมด้วยสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารคัดเลือก และกำจัด *Agrobacterium* โดยใช้สารปฏิชีวนะ Cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารคัดเลือกต่ออีกจนครบ 16 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* อัตราส่วน 1:10 ทำการบ่มร่วมกับเนื้อเยื่อเป็นเวลา 10 นาที มีคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอดีที่สุด คือ 1.40 คะแนนและมีขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอคือ 0.68 ตารางเซนติเมตร ซึ่งน่าจะเป็นความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ บัวหลวงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ปราการ กระถินทอง และสุกัญญา สำลีทอง (2543) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ความเข้มข้น OD 0.1 และ 0.01 ความเข้มข้นของอะซีโตไซลิงโกน 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย้ายยีนในแคลลัสอายุ 5 7 และ 9 วันของข้าวสายพันธุ์เจ้าหอมคลองหลวง 1 พบว่า ในแคลลัสอายุ 9 วัน ความเข้มข้นของอะซีโตไซลิงโกน 100 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ความเข้มข้น OD 0.1 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย้ายยีน โดยมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่มีการแสดงออกของยีน GUS เฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากขนาดตายอดจากเอมบริโอและคะแนนชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* และระยะเวลาที่ใช้ ทั้ง 3 วิธีการนั้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่า วิธีการที่ 3 ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 1:10 แช่นาน 10 นาที ให้คะแนนการเจริญเติบโตดีที่สุด มีแนวโน้มที่เนื้อเยื่อจะเจริญเติบโตต่อไปได้ดีกว่าวิธีการอื่น ถึงแม้ว่าชิ้นส่วนจะมีขนาดเล็กกว่าวิธีการอื่น แต่อย่างไรก็ตามจะต้องทำการตรวจสอบผลของการถ่ายยีนหลังจากการชักนำให้เกิดต้น โดยทำการตรวจสอบการเข้าไปของ DNA ภายในต้นพืชโดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ระดับความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมและระยะเวลาในการบ่มเชื้อร่วมกับชิ้นส่วนของตายอดจากเอมบริโอ นั้น พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 (pBI121DFR)และระยะเวลาในการบ่มเชื้อรวมกับเนื้อเยื่อตายอดจากเอมบริโอที่ดีที่สุด คือ ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium* อัตราส่วน 1:10 ทำการบ่มร่วมกับเนื้อเยื่อเป็นเวลา 10 นาที มีแนวโน้มที่จะได้ชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเติบโตดีกว่าวิธีการอื่น โดยมีขนาดของเนื้อเยื่อเล็กกว่าวิธีการอื่น แต่มีแนวโน้มว่าจะเจริญเติบโตต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์. สำนักงานพาณิชย์จังหวัดชลบุรี. 2538. เอกสารเผยแพร่เรื่อง ไม้ดอกไม้ประดับตาม โครงการพัฒนาตลาด เพื่อสนับสนุนการกระจายการผลิตในระดับจังหวัด. 32หน้า

กสิน สุวตะพันธ์ .2500. บัวนานาพันธุ์ .พฤกษชาติ .1(1): 40 – 47.

คณิตา เลขะกุล.2535.บัว: ราชินีแห่งน้ำ. มูลนิธิสวนหลวง ร.9 .กรุงเทพมหานคร.

จารีย์ หอยทอง .2519 .“การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาชีววิทยา สาขาพฤกษศาสตร์ . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .กรุงเทพมหานคร.

ไชยา-ลดาวัลย์. 2541. การปลูกบัว. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี

ฐิติมา วงษ์การค้า และ สุภาลัย ไชยสุต. 2544. การย้ายยีนในหญ้าโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ณพพร คำรงศิริ. 2530. พฤกษอนุกรมวิธาน. กรุงเทพมหานคร: น่ำกังการพิมพ์

เทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ และ ชำรง เงาภู่ทอง. 2544. การย้ายยีนในข้าวเหนียวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

บุญญานารถ นาถวงษ์ .2545 .ข่าวสารศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพ และความปลอดภัยทางชีวภาพ . พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน .นครปฐม.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพมหานคร. โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

ประวีณา มณีรัตนรุ่งโรจน์ สุมนทิพย์ บุนนาค และปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์ .2546. การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงินโดย *Agrobacterium tumefaciens* .คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี .มหาวิทยาลัยขอนแก่น .3 หน้า.

ประสิทธิ ศรีอริยะวงศ์ และ พงศธร กิมเฮง. 2542. การย้ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปราการ กระถินทอง และ สุกัญญา สำลีทอง. 2543. การย้ายยีนในข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมและเครื่องยิง. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ปรีชา ประเทพา. 2543. เทคโนโลยีชีวภาพ: การปรับปรุงแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. มหาสารคาม.

รองรอง หอมหวล. 2541. เทคนิคการถ่ายยีนในกุหลาบ. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

รัชนี ฉวีราช. 2532. พรรณไม้น้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 17(3): 147 – 151 (2532).

วาสนา มิตรานนท์. 2527. "การศึกษาลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง(Nelumbo Adans.) ในประเทศไทย" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. หนังสือคู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2543. สัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ครั้งที่13. กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร.

สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย .2520 .ทะเบียนพันธุ์ไม้ประดับ.กรุงเทพมหานคร.บพิธการพิมพ์

สายชล เกตุษา .2531. เทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวของดอกไม้ .กรุงเทพฯ: บพิธการพิมพ์.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. พรรณไม้น้ำ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 234 หน้า.

สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2533. เทคนิคการปลูกบัว. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะ เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 52 หน้า

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 184 – 204 หน้า

เสริมลาภ วสุวัต .2537. บัวไม้ดอกไม้ประดับ .กรุงเทพฯ: อมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. ม.ป.ป. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช. (Online). Available : http://www.rdi.ku.ac.th.GMOS/GMOs2/2_1/index4.htm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Albarran, J.G. 1998. "In vitro culture of *swietenia macrophylla.* Optimum condition for regeneration and genetic transformation "Revista Forestal Venezolana".31(41 – 2): 111- 118

Backer, C.A. and R.C. Bakbuizen Vender Brink . 1963. Flora of java. Netherland (Groningen): N.V.P. Noordhoff.

Bailey, I. h. 1954. Manual of Cultivated Plant. The Macmillan Company, New York.

อ้างโดย วาสนา มิตรนนท์. 2527. "การศึกษาลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง (Nelumbo Adans.)ในประเทศไทย" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

Burkill, I.H. 1966. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. Vol. 2. Kuala Lumpur : Ministry of Agiculture and Cooperatives.

Core, L.E. 1955. Plant Taxonomy. Englewood Cliffs. New Jersey: prentice-Hall,Inc. 459 p.

Dipali, G. 2001. "Thidiazuron induced regeneration in *Cuminum cyminum* L." Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 10(1): 61 – 62.

Hiei, Y. and Komari, T., 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens.* PlantMol.Biol. 35: p. 205-218.

Hooykass, V.S., Hooykass, G.M.S., and Schilperoort, R.A., 1984. Expression of Ti plasmid genes in Monocotyledonous plant infected with *Agrobacterium tumefaciens*. Nature. 311:763-4.

Kim, T. and Y. Kim. 2000. Heterolpgous expression of *AmAl* gene encoding sorage protein of Amaranthus in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). Faculty of Biological Science,Chonbuk National University, 14(5): 495 – 498.

Lutfor, R.S.M., Ebina, M., Miural, Y. and Nakagawa, H., 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transformation of Japanese lawangrass (Zoysia japonica Steud.). Plant and Animal Genome VIII Conference. January 9-12.

Murashige, T. and Skoog,F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture." Physiol Plant. 15:473-497.

Paiva, D.O. 1997. " *In vitro* propagation of gloxinia." Pevista Brasileira de Horticulturae Onamental. 3(2): 29 – 41.

Stahcel, S.E., Messen, E., Montag, M. and Zambrisky, P.,1985. Identification of signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens.*Nature. 138 :624-629

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supuk mahadtanapuk, Nopmanee Topoonyanont, Takashi Handa, Mondhon Sanguansermsri, Somboon Anuntalabhochai. 2005. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagncp. using retarded shoot. Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chaing Mai.50200

Xiaomei, L. and P.M. Pijut. 2006. Adventitious shoot regeneration and genetic transformation of *Prunus serotina* (black cherry) for reproduction sterility. Purdue University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ 1 ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashinge and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
$CaCl_2 .2H_2O$	440.00
$MgSO_4 .7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4 .4H_2O$	22.30
$ZnSO_4 .7H_2O$	8.60
KI	0.83
$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.25
$CuSO_4 .5H_2O$	0.025
$CoCl_2 .6H_2O$	0.025
$FeSO_4 .7H_2O$	27.80
$Na_2MoO_4 .7H_2O$	37.30
Myo – inositol	100.00
Nicotinic	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.40
Glycine	2.00
Sucrose	3000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (Yeast extract –Malt extract medium)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
MANNITOL	10.00
YEAST EXTRACT	0.40
MgSO4- 7H2O	0.20
K2HPO4-3H2O	0.50
NaCl	0.10
วุ้น	15.00
ที่ pH 7	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.0376	0.0094	6.71	0.0014*
Error	20	0.0280	0.0014		
Total	24	0.0656			

Grand mean = 0.3240 CV = 11.54 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.0544	0.0136	1.79	0.1706^{ns}
Error	20	0.1520	0.0076		
Total	24	0.2064			

Grand mean = 0.3120 CV = 27.94 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.0404	0.0101	2.59	0.0679^{ns}
Error	20	0.7800	0.0039		
Total	24	0.1184			

Grand mean = 0.5580 CV = 11.19 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.0927	0.0231	0.83	0.5245^{ns}
Error	20	0.5616	0.0280		
Total	24	0.6544			

Grand mean = 0.6640 CV = 25.23 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.8242	0.2060	2.77	0.0556^{ns}
Error	20	1.4878	0.0743		
Total	24	2.3120			

Grand mean = 0.6640 CV = 41.07 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 12

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.6334	0.1583	1.58	0.2182^{ns}
Error	20	2.0040	0.1002		
Total	24	2.6374			

Grand mean = 0.6520 CV = 48.54 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 14

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.4834	0.3708	3.55	0.0240*
Error	20	2.0866	0.1043		
Total	24	3.5700			

Grand mean = 0.7496 CV = 43.08%

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 16

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.3745	0.3436	2.54	0.0721^{ns}
Error	20	2.7096	0.1354		
Total	24	4.0842			

Grand mean = 0.8124 CV = 45.30%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	6.6400	1.6600	1.22	0.3334^{ns}
Error	20	27.2000	1.3600		
Total	24	33.8400			

Grand mean = 3.0800 CV = 37.86 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	7.8400	1.9600	3.38	0.0288*
Error	20	11.6000	0.5800		
Total	24	19.4400			

Grand mean = 3.3200 CV = 22.93%

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 11 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	16.2400	4.0600	7.81	0.0006**
Error	20	10.4000	0.5200		
Total	24	26.6400			

Grand mean = 2.8800 CV = 25.03 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	33.8400	8.4600	16.27	0.0001**
Error	20	10.4000	0.5200		
Total	24	44.2400			

Grand mean = 2.5208 CV = 28.61 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 13 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	13.2000	3.3000	7.50	0.0007**
Error	20	8.8000	0.4400		
Total	24	22.0000			

Grand mean = 1.6000 CV = 41.45 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวกที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 12

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.2000	0.3000	0.56	0.6974^{ns}
Error	20	10.8000	0.4400		
Total	24	12.0000			

Grand mean = 1.2000 CV = 61.23%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 14

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	2.1600	0.5400	1.04	0.4121^{ns}
Error	20	10.4000	0.5200		
Total	24	12.5600			

Grand mean = 1.2400 CV = 58.15%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 16 แสดงการวิเคราะห์ผลคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่เลี้ยงบนอาหาร MS ภายหลังได้รับการถ่ายยีนในสัปดาห์ที่ 16

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.3600	0.3400	0.61	0.6621 ^{ns}
Error	20	11.2000	0.5600		
Total	24	12.5600			

Grand mean = 1.2400 CV = 60.34 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้