สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่และการถ่ายโอนดีเอ็นเอของหญ้าแฝก

A STUDY ON PLANT REGENERATION AND DNA TRANSFORMATION OF *Vetiveria* sp.

T110388

ชนนิกานต์ ขวัญช่วย

CHONNIKARN KHUNCHUAY

เลขหมู่ 110388
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี - 2 ก.ย. 2553

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2553

KMITL-2010-AG-M-101-056

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A STUDY ON PLANT REGENERATION AND DNA TRANSFORMATION OF *Vetiveria* sp.

CHONNIKARN KHUNCHUAY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2010

KMITL-2010-AG-M-101-056

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2010

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่และการถ่ายโอนดีเอ็นเอของหญ้าแฝก

A Study on Plant Regeneration and DNA Transformation of *Vetiveria* sp.

นักศึกษา นางสาวชนนิกานต์ ขวัญช่วย

รหัสประจำตัว 50065804

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วิรัตน์ ภูวิวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.สุเม	อรัญนารถ	
รศ.ภัญชนา	มีแก้วกุญชร	
ผศ.ดร.กัญจนา	แซ่เตียว	
รศ.ดร.วิรัตน์	ภูวิวัฒน์	
ผศ.ดร.กนกพร	สมพรไพลิน	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ วันที่ 18 พฤษภาคม 2553 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร 1 (ชั้น 1 อาคารบุนนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 21 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.
วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์
วันที่ 4 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 53
ลงชื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่และการถ่ายโอนดีเอ็นเอของหญ้าแฝก
นักศึกษา	นางสาวชนนิกานต์ ขวัญช่วย
รหัสประจำตัว	50065804
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ. ศ.	2553
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.วิรัตน์ ภูวิวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

หญ้าแฝกเป็นพืชที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในประเทศไทย กระบวนการถ่ายโอนดีเอ็นเอและการชักนำให้เกิดต้นใหม่ถือเป็นวิธีการที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าชนิดนี้ ในการทดลองครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส และการชักนำให้เกิดต้นใหม่ โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์ คือ สุราษฎร์ธานี และราชบุรี จากการทดลอง พบว่า หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีมีการพัฒนาเป็นแคลลัสสูงสุด (82.50 เปอร์เซ็นต์) บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีมีการพัฒนาเป็นแคลลัสสูงสุด (60 เปอร์เซ็นต์) บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นย้ายแคลลัสที่ได้ลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.00-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรี สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในปริมาณสูงที่สุด 80.00 และ 15.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ได้มีการใช้อะโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ซึ่งมีส่วนของยีน β-glucuronidase ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S สำหรับการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่แคลลัสหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะการชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่ดีที่สุด พบว่า มีเพียงหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเมื่อใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 คิดเป็น 5.45 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค gus assay และ PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	A Study on Plant Regeneration and DNA Transformation of *Vetiveria* sp.
Student	Miss Chonnikarn Khunchuay
Student ID.	50065804
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2010
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Wirat Phuwiwat
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

ABSTRACT

Vetiver grass has been extensively promoted about the usefulness in Thailand. Plant transformation and regeneration are important tools for the genetic improvements of this grass. In this study, callus induction and regeneration from the auxiliary buds of 2 vetiver grass cultivars, Ratchaburi and Suratthani, were performed. The results presented that grass cultivar Suratthani had the highest callus induction (82.5%) on MS medium supplemented with 2.00 mg/L NAA and 1.00 mg/L BA. The grass cultivar Ratchaburi, on the other hand, had the highest callus induction (60%) on MS medium supplemented with 1.00 mg/L 2,4-D and 0.50 mg/L BA. These calli were subjected into regeneration medium containing 2.00 mg/L BA and various concentrations of NAA (0.00-1.00 mg/L). At 6 weeks after incubation, the highest regeneration of grass cultivar Suratthani and Ratchaburi were 80% and 15% on regeneration medium supplemented with 1.00 and 0.75 mg/L NAA respectively. Three strains of *Agrobacterium* bearing β-glucuronidase driven by a CaMV 35S promoter were used as the mediated transformation of calli from both grass cultivars under the best of tested regeneration method. Only Suratthani calli infected with *Agrobacterium* strain LBA 4404 (pCAMBIA 1301) were demonstrated the T-DNA integrated plant by 5.45% after confirmation with gus assay and PCR method.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. กนกพร สมพรไพลิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ดร. สุธี ชุติไพจิตร อาจารย์ประจำวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยี ที่ช่วยชี้แนะแนวทางในการศึกษาวิจัย ตรวจสอบแก้ไขข้อผิดพลาด ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาพืชสวน และ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ช่วยอบรมสั่งสอนตลอดจนให้ความรู้

ขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์เงินทุนในการสนับสนุนการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนกรมพัฒนาที่ดิน จังหวัดกรุงเทพมหานคร และ จังหวัดเพชรบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ต้นพันธ์หญ้าแฝกในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือด้วยความเต็มใจเสมอมา สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา คุณตา คุณยาย และทุกคนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจคอยห่วงใย และให้การสนับสนุนด้านการศึกษาเสมอมา จนสามารถประสบความสำเร็จในครั้งนี้

ชนนิกานต์ ขวัญช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... VIII

สารบัญภาพ..... IX

รายการคำย่อ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน..... 2

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน..... 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 หญ้าแฝก..... 3

2.1.1ลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... 3

2.1.2 สายพันธุ์หญ้าแฝก..... 4

2.1.3 การขยายพันธุ์..... 7

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 7

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 7

2.2.2 รูปแบบการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง..... 8

2.3 การถ่ายฝากยีนในพืช..... 11

2.3.1 เทคนิคการถ่ายฝากยีนในพืช..... 11

2.3.2 ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช..... 13

2.3.3 การตรวจสอบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน..... 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 18

3.1 พืชทดลอง 18

3.2 เชื้อแบคทีเรีย 18

3.3 อุปกรณ์ 18

3.4 สารเคมี 19

3.5 วิธีการ 20

3.5.1 ศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 20

3.5.2 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ 21

บทที่ 4 ผลการทดลอง 24

4.1 ผลการทดลองการศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 24

4.1.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์ 24

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด 24

4.2 ผลการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ. 31

4.2.1 ผลของการพัฒนาเป็นต้นใหม่ภายหลังการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 31

4.2.2 ผลของหญ้าแฝกที่ผ่านการถ่ายโอนยีนเมื่อทำการคัดเลือกบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ 31

4.2.3 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gus assay 31

4.2.4 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction : PCR 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 38

5.1 ผลการทดลองการศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 38

5.1.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์..... 38

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น..... 39

5.2 ผลการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ..... 40

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 41

6.1 ผลการศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 41

6.1.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์..... 41

6.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น..... 41

6.2 ผลการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ..... 42

6.2.1 ผลของหญ้าแฝกที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอเมื่อทำการคัดเลือกบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ..... 42

6.2.2 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gus assay..... 42

6.2.3 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction : PCR..... 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม..... 44

ภาคผนวก ก..... 50

ภาคผนวก ข..... 55

ประวัติผู้เขียน..... 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ความแตกต่างของหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอน..... 6

4.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนตาข้าง ของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรี ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์..... 27

4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5 ระดับความเข้มข้นร่วมกับ BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีต่อการชักนำแคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรีให้พัฒนาเป็นยอดที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ 29

4.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5 ระดับความเข้มข้นร่วมกับ BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีต่อจำนวนยอดต่อแคลลัสและความยาวยอดของหญ้าแฝก สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรีที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์..... 30

4.4 ผลการศึกษาการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA131 และ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิดpCAMBIA1301..... 36

4.5 ผลการศึกษาการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA131 และ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงส่วนต่างๆ ของหญ้าแฝก	5
2.2 แสดงกลไกการส่งถ่าย T-DNA จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียมเข้าสู่พืช	14
4.1 แสดงลักษณะแคลลัสหญ้าแฝกที่ชักนำจากชิ้นส่วนตาข้างที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์.	28
4.2 แสดงการพัฒนาของยอดหญ้าแฝกจากชิ้นส่วนแคลลัส	26
4.3 แสดงแคลลัสหญ้าแฝกที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม	33
4.4 หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่เจริญบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ	34
4.5 ผลการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Gus assay	34
4.6 แสดงผลการตรวจสอบการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณ ชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ CaMV35S ขนาด 376 คู่เบส	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

ตัวย่อ	
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
AAM	Amino Acid Medium
BA	Benzyladenine
BAP	Benzylaminopurine
hpt	Hygromycin phosphotransferase
IAA	Indoleacetic acid
IBA	Indolebutyricacid
LB	Luria Broth
MS	Murashike and Skoog
NAA	Naphthaleneaceticacid
NPTII	Neomycin phosphotransferase
T-DNA	Transfer DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันทั่วโลกมีความสนใจและให้ความสำคัญกับผลิตผลจากพืชมากขึ้น จึงมีการศึกษาผลผลิตของพืชหลายชนิดเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ รวมไปถึง หญ้าแฝก ตามโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ที่ทรงเล็งเห็นถึงความสำคัญของพืชดังกล่าว หญ้าแฝก (Vetiver grass) เป็นพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) จากการศึกษาพบว่าในประเทศไทยมีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ หญ้าแฝกหอมหรือหญ้าแฝกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* Nash) และหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A. Camus) ในธรรมชาติพบว่าหญ้าแฝกทั้ง 2 ชนิด มีการกระจายได้ดีในสภาพพื้นที่ทั้งที่ลุ่มและที่ดอนในดินสภาพต่าง ๆ เป็นพืชที่มีระบบรากหยั่งลึกเจริญออกทางแนวดิ่งมากกว่าออกทางด้านข้างและมีจำนวนรากมากจึงเป็นพืชที่ทนแล้งได้ดี รากประสานติดต่อกันแน่น และสามารถกักเก็บน้ำและความชื้นได้ ระบบรากแผ่ขยายกว้างโดยรอบกอเท่านั้นไม่เป็นอุปสรรคต่อพืชที่ปลูกข้างเคียง (กรมพัฒนาที่ดิน. 2549) หญ้าแฝกจึงเป็นพืชที่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง อาทิเช่น ด้านการป้องกันการพังทลายของหน้าดิน ลดการสูญเสียของแร่ธาตุที่จำเป็นในดิน เช่น ฟอสฟอรัส และไนโตรเจน (Owino *et al.* 2005) ดูดซับโลหะหนักหลายชนิดที่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม และพืช เช่น ตะกั่ว ทองแดง สังกะสี และแคดเมียม (Chen *et al.* 2004) ให้ความชุ่มชื้นแก่ดินและลดการสูญเสียน้ำในดิน เนื่องจากหญ้าแฝกมีระบบรากหยั่งลึก จึงมีส่วนช่วยให้ดินมีความชุ่มชื้นเพิ่มมากขึ้น (กรมพัฒนาที่ดิน. 2549) ใช้เป็นอาหารสัตว์ จากการศึกษาหญ้าแฝกสายพันธุ์ กำแพงเพชร 2 พบว่ามีคุณค่าทางอาหารที่เหมาะสมให้สัตว์บริโภคได้ ทั้งทางด้านปริมาณโปรตีนหยาบ วัตถุแห้งที่ย่อยได้ และแร่ธาตุต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำหญ้าแฝกสดมาทำการหมักโดยเติมสารช่วยหมัก มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น (วารุณี พานิชผล และคณะ. 2538) นอกจากนี้ยังมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น ชิ้นแฝกอัดที่นำมาใช้ในการผลิตเครื่องเรือน และเครื่องใช้สอยภายในครัวเรือน ทดแทนการใช้ไม้จริง (กรมป่าไม้. 2543)

เนื่องจากคุณประโยชน์ต่าง ๆ ที่กล่าวมา จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของหญ้าแฝกเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการ และใช้สำหรับการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ของหญ้าแฝกเพื่อให้มีคุณสมบัติตามต้องการ เช่น พันธุ์ที่สามารถปลูกได้ในสภาพอากาศหนาว ในสภาพพื้นที่ดินเค็ม หรือเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญที่มีความจำเป็นให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ด้วยเหตุนี้งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายโอนดีเอ็นเอและการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของหญ้าแฝกเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์พืชเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของหญ้าแฝกโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่หญ้าแฝกโดยการใช้อะโกรแบคทีเรียม

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และ ห้องปฏิบัติการวิจัยทางดีเอ็นเอเทคโนโลยี วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน

ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึง เดือนมีนาคม 2553

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.5.2 ทราบสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียม และพลาสมิดที่เหมาะสมในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝก

1.5.3 เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าแฝกโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หญ้าแฝก

หญ้าแฝกจัดเป็นหญ้าเขตร้อนพบกระจายอยู่ทั่วไปหลายพื้นที่ แหล่งเดิมหรือศูนย์กลางการกระจายสันนิษฐานว่าอยู่บริเวณตอนกลางและตอนใต้ของประเทศอินเดีย และได้แพร่กระจายลงมาครอบคลุมตลอดภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการกระจายทั่วไปขึ้นได้ดีในสภาพพื้นที่ทั้งที่ลุ่มและที่ดอนในสภาพดินต่าง ๆ จากความสูงใกล้ระดับน้ำทะเล จนถึงระดับประมาณ 800 เมตร (กรมพัฒนาที่ดิน. 2541)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อสามัญ Vetiver grass

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vetiveria* sp.

ชื่อวงศ์ Gramineae

ถิ่นกำเนิด ประเทศอินเดีย

ลักษณะทั่วไป พืชตระกูลหญ้า มีความสูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร ขึ้นเป็นกอแน่น เส้นผ่านศูนย์กลางกอประมาณ 30 เซนติเมตร ลักษณะใบแคบยาวประมาณ 75 เซนติเมตร กว้างประมาณ 8 มิลลิเมตร สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ (วีระชัย ณ นคร. 2536)

ลำต้น (Culm)

หญ้าแฝกเป็นหญ้าที่ขึ้นเป็นกอ มีลักษณะเป็นพุ่ม ใบยาวตั้งตรง โคนกอเบียดกันแน่นเป็นลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากหญ้าชนิดอื่นค่อนข้างชัดเจน โคนลำต้นแบนเกิดจากโคนใบที่จัดเรียงพับซ้อนกัน ลำต้นแท้มีขนาดเล็กซ่อนอยู่ในกาบใบบริเวณคอใบ หญ้าแฝกจะมีการแตกหน่อใหม่ทดแทนต้นเก่าอยู่เสมอ ทำให้กอมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ(ภาพที่ 2.1ก.)

ใบ (Leaf)

ใบแตกจากโคนใบมีลักษณะแคบยาว ขอบขนานปลายสอบแหลม แผ่นใบกร้านคายโดยเฉพาะใบแก่ขอบใบและเส้นกลางใบมีหนามละเอียด (spinulose) ท้องใบมีสีจางกว่าด้านหลังใบ(ภาพที่ 2.1ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราก (Root)

รากสานกันแน่นหยั่งลึกในแนวดิ่งไม่แผ่ขนาน มีรากแกน รากแขนง และรากฝอยจำนวนมาก รากแกนที่บริเวณโคนกอมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.00-3.00 มิลลิเมตร ผนังด้านนอกแข็ง ลักษณะอวบคล้ายนวม(ภาพที่ 2.1ข.)

ช่อดอก (Inflorescence)

ช่อดอกตั้งมีลักษณะเป็นรวง ก้านช่อดอกยาวกลม ก้านช่อดอก และรวงสูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร(ภาพที่ 2.1ง.)

ดอก (Spikelet)

ดอกเรียงตัวอยู่ด้วยกันเป็นคู่ ๆ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่ละคู่ประกอบด้วยดอกชนิดที่ไม่มีก้าน (sessile spikelet) และดอกชนิดมีก้าน (pedicelled spikelet) ดอกที่ไม่มีก้านดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศที่มีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ด้วยกัน (hermaphrodite spikelet) ส่วนดอกมีก้านจะเป็นดอกตัวผู้ (male spikelet) ในแต่ละดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) อีก 2 ดอก ดอกมีลักษณะคล้ายกระสวย ขอบขนานรูปไข่ ผิวบนด้านหลังขรุขระมีหนามแหลมขนาดเล็ก (spinulose) โดยเฉพาะที่บริเวณขอบเห็นได้ชัดเจน

เมล็ด (Seed)

เมื่อดอกหญ้าแฝกได้รับการผสมแล้ว ดอกที่ไม่มีก้านดอกที่เป็นดอกสมบูรณ์จะติดเมล็ด เมล็ดมีสีน้ำตาลอ่อน รูปกระสวยผิวเรียบ หัวท้ายมน กว้าง 1.00-1.50 มิลลิเมตร ยาว 2.50-3.00 มิลลิเมตร เมล็ดมีผนังบางเนื้ออ่อนแบบเมล็ดสาคู

2.1.2 สายพันธุ์หญ้าแฝก

ในประเทศไทยนักพฤกษศาสตร์ได้พบหญ้าแฝก 2 ชนิด คือ หญ้าแฝกหอมหรือแฝกลุ่ม และหญ้าแฝกดอน

2.1.2.1 หญ้าแฝกหอมหรือแฝกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* Nash) เป็นพืชที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี มีการกระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ และมีความสามารถในการผสมข้ามต้นทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม หญ้าแฝกหอมมีใบยาว 45-90 เซนติเมตร กว้าง 0.60-0.90 เซนติเมตร มีหลังใบโค้งปลายใบแบนมีสีเขียวเข้ม เนื้อใบค่อนข้างเนียนมีไขเคลือบทำให้ดูมัน ท้องใบออกสีขาวซีดกว่าด้านหลังใบ ส่วนรากจะมีกลิ่นหอม สามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ รากหยั่งลึกได้ประมาณ 1 เมตร มีชื่อเรียกตามพื้นที่ ๆ ปลูก ได้แก่ พันธุ์สุราษฎร์ธานี พันธุ์สงขลา3 พันธุ์กำแพงเพชร2 และพันธุ์ศรีลังกา(ตารางที่ 2.1) (กรมพัฒนาที่ดิน. 2546)

2.1.2.2 หญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A. Camus) หญ้าแฝกดอนหรือแฝกพื้นบ้าน มีการกระจายพันธุ์อยู่ในวงแคบ ๆ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คือ ประเทศไทย ลาว เขมร เวียดนาม และมาเลเซีย สามารถเจริญได้ดีในสภาพแดดปานกลาง และแดดจัด หญ้าแฝกดอนมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบยาว 35-60 เซนติเมตร กว้าง 0.40-0.60 เซนติเมตร ใบสีเขียวซีด หลังใบพับเป็นสันสามเหลี่ยม เนื้อใบหยาบ และสาก มีไขเคลือบน้อยทำให้ดูกร้าน ท้องใบออกสีซีดกว่าด้านหลังใบเล็กน้อย ช่อดอกจะมีได้หลายสี ได้แก่ สีขาวครีมถึงสีม่วงอมแดง ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ โดยทั่วไปหญ้าแฝกดอนที่มีอายุประมาณ 1 ปี มีรากหยั่งลึกประมาณ 80-100 เซนติเมตร มีชื่อเรียกตามพื้นที่ ๆ ปลูก ได้แก่ พันธุ์ราชบุรี พันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ พันธุ์เลย พันธุ์นครสวรรค์ พันธุ์ร้อยเอ็ด และพันธุ์กำแพงเพชร(ตารางที่ 2.1) (กรมพัฒนาที่ดิน. 2546)

ภาพที่ 2.1 แสดงส่วนต่างๆ ของหญ้าแฝก ลำต้น (ก) ราก (ข) ใบ (ค) ช่อดอก (ง) และดอก (จ)
ที่มา : นิรนาม (2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของหญ้าแฝกลุ่มและหญ้าแฝกดอน

หญ้าแฝกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* Nash.)	หญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A.Camus)
ถิ่นกำเนิด - ตอนกลางของทวีปเอเชีย สันนิษฐานว่าอยู่ในประเทศอินเดีย	**ถิ่นกำเนิด** - เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แถบประเทศไทย ลาว เขมร และเวียดนาม
ลักษณะกอ - มีพุ่มใบยาวตั้งตรงขึ้นสูงประมาณ 150-200 เซนติเมตร - มีการแตกตะเกียงและแขนงลำต้นได้	**ลักษณะกอ** - เป็นพุ่ม ใบยาวและแผ่โค้งลงคล้ายกอตะไคร้ ตั้งตรงสูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร - ไม่มีการแตกตะเกียงและแขนงลำต้น
ใบ - ยาว 45-90 เซนติเมตร กว้าง 0.6-0.9 เซนติเมตร - ใบสีเขียวเข้ม หลังใบโค้ง ท้องใบออกสีขาว เนื้อใบค่อนข้างเนียน มีไขเคลือบมากทำให้ดูนุ่ม และมัน	**ใบ** - ยาว 36-80 เซนติเมตร กว้าง 0.4-0.6 เซนติเมตร - ใบสีเขียวซีด หลังใบพับเป็นสันแข็ง เนื้อใบหยาบ สากคาย มีไขเคลือบน้อยทำให้ไม่เหลือบมัน
ช่อดอกและดอก - ช่อดอกสูง 150-250 เซนติเมตร - มีสีอมม่วง - ดอกย่อยไม่มีรยางค์แข็ง	**ช่อดอกและดอก** - ช่อดอกสูง 100-150 เซนติเมตร - มีหลายสี ทั้งสีขาวครีม สีม่วง - ดอกมีรยางค์แข็ง
เมล็ด - ขนาดโตกว่าหญ้าแฝกดอนเล็กน้อย	**เมล็ด** - ขนาดเล็กกว่าหญ้าแฝกลุ่ม
ราก - มีน้ำมันระเหยอยู่เฉลี่ย 1.4-1.6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง - รากหยั่งลึกได้ประมาณ 1000 เซนติเมตร	**ราก** - ไม่มีน้ำมันหอมระเหย - รากหยั่งลึกได้ประมาณ 0.08-100 เซนติเมตร

ที่มา : กรมพัฒนาที่ดิน. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การขยายพันธุ์

โดยทั่วไปหญ้าแฝกมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติด้วยเมล็ด หน่อและแขนง แต่ที่นิยมในปัจจุบันคือการแยกหน่อ เนื่องจากทำได้สะดวกและรวดเร็ว การขยายพันธุ์หญ้าแฝกมีหลายวิธีด้วยกันเช่น

2.1.3.1 การขยายพันธุ์ในแปลงปลูก โดยการแยกหน่อจากกอ ตัดใบให้ยาวประมาณ 20 เซนติเมตร ตัดรากให้สั้น แช่ในน้ำประมาณ 5-7 วัน เมื่อรากงอกนำออกปลูกในแปลงปลูก หรือในถุงเพาะชำ

2.1.3.2 การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำหน่อหรือช่อดอกอ่อนของหญ้าแฝกผ่านกระบวนการปลอดเชื้อ เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และแสง วิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณหญ้าแฝกได้มากในเวลาที่รวดเร็ว มีความแข็งแรงสม่ำเสมอ เมื่อนำออกปลูกจะได้กอหญ้าแฝกที่มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ แต่จำเป็นต้องใช้หน่อใหม่เป็นแม่พันธุ์เป็นระยะๆ (กรมพัฒนาที่ดิน. 2549)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ตายอด ตาข้าง เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนของพืชจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปในรูปแบบต่าง ๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอมบริโอ (embryo) หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวนมาก การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชสามารถควบคุมได้โดยการเลือกใช้สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540)

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (นิตย์ศรี แสงเดือนและ สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2548)

2.2.1.1 อาหารสังเคราะห์ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีด้วยกันหลายสูตร หลักในการเลือกใช้อาหาร ควรเลือกสูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับความต้องการของเซลล์หรือเนื้อเยื่อในสภาพธรรมชาติ โดยทั่วไปอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วย

ธาตุอาหารหลัก เช่น NH_4, NO_3, Ca, Mg และ K

ธาตุอาหารรอง เช่น Mn, Zn, Cu, Co, และ Mo

แหล่งที่ให้ธาตุเหล็ก ได้แก่ EDTA

แหล่งคาร์บอน ให้พลังงาน เช่น ซูโครส กลูโคส และมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นส่วนประกอบหนึ่งของอาหารสังเคราะห์ที่มีความสำคัญในการชักนำส่วนของพืชให้เกิดเป็นแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ที่นิยมใช้ คือสารในกลุ่ม ออกซิน และไซโตไคนิน การใช้ออกซินที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งเสริมการเกิดราก ในขณะเดียวกันการใช้ไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นสูงจะชักนำให้เกิดยอด แต่ถ้าใช้ระดับความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินในอัตราที่พอเหมาะ จะชักนำให้เกิดแคลลัส

2.2.1.2 ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญเติบโตหรืออายุของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

2.2.1.3 เทคนิคปลอดเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยง เครื่องมือ เครื่องใช้ ตลอดจนบริเวณที่ใช้เพาะเลี้ยง และส่วนของพืชที่ใช้ต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

2.2.1.4 สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ชนิดและความเข้มของแสง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และความชื้นสัมพัทธ์

2.2.2 รูปแบบการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยง แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ

2.2.2.1 การเกิดแคลลัส (callus) แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากหรือลำต้น อาจมีการเกาะอย่างหลวมๆ หรือเกาะกันแน่น มีด้วยกันหลายสี เช่น สีขาว เหลือง ม่วง แดง และเขียว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรงควัตถุภายในเซลล์ แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้โดยการเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นของออกซิน และไซโตไคนินให้เหมาะสม (คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542)

2.2.2.2 เอมบริโอเจนเนซีส (embryogenesis) คือ กระบวนการที่ชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดเนื้อเยื่อที่เหมือนกับเอมบริโอ เนื้อเยื่อที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เรียกว่า เอมบริโอเจนนิกแคลลัส (embryogenic callus) ส่วนที่ไม่สามารถเกิดเป็นต้นได้ เรียกว่า นอนเอมบริโอเจนนิกแคลลัส (non-embryogenic callus) เซลล์ที่จะกลายเป็นเอมบริโอมักมีไซโตพลาสซึมหนาแน่น มีเม็ดแป้งและนิวเคลียสใหญ่ มีการพัฒนาเป็นลำดับ จากรูปทรงกลม (globular shape) เป็นรูปหัวใจ (heart shape) และรูปทรงยาว (torpedo shape) ก่อนจะกลายเป็นต้นอ่อน (อารี วรัญญูวัฒน์. 2541)

2.2.2.3 ออร์แกโนเจนเนซีส (organogenesis) คือ กระบวนการเกิดส่วนใด ๆ ของต้นพืช เช่น ยอด หรือราก จากจุดกำเนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ตายอด เมื่อเกิดแคลลัสกลุ่มของเซลล์อาจมีทั้งแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชโดยผ่านกระบวนการออร์แกโนเจนเนซีส และเอมบริโอเจนเนซีส ที่เรียกว่า มอร์โฟเจนนิกแคลลัส (morphogenic callus) ส่วนแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นรากหรือยอด เรียกว่า นอนมอร์โฟเจนนิกแคลลัส (non-morphogenic callus) (อารี วรัญญูวัฒน์. 2541)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝก เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณหญ้าแฝกที่ปลอดเชื้อได้ในปริมาณมาก ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว เมื่อเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับการขยายพันธุ์โดยวิธีการทั่วไป ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณพืชตระกูลหญ้าและหญ้าแฝกโดยวิธีการนี้อย่างแพร่หลาย ดังนี้

เล็ก มอญเจริญ และคณะ (2538) ศึกษาการขยายพันธุ์หญ้าแฝกโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนหน่อหญ้าแฝก 3 สาย พันธุ์ คือ ญี่ปุ่น ศรีลังกา และอินเดียใต้ โดยนำหน่อหญ้าแฝกที่มีส่วนของตาข้างหรือตายอดติดอยู่มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้หญ้าแฝกมีการแตกยอด เมื่อย้ายชิ้นส่วนลงอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมแต่ลด BAP เหลือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม IBA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหญ้าแฝกมีการแตกยอดเพิ่มขึ้น10-20 เท่าภายในเวลา 4-6 สัปดาห์ โดยยอดที่เกิดใหม่มีขนาดเล็กลงและมีปริมาณมากมาย จากนั้นชักนำให้เกิดรากโดยตัดแยกชิ้นส่วนยอดลงเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประมาณ 3-4 สัปดาห์ ทำการย้ายกล้าหญ้าแฝกออกปลูก พบว่ามีอัตราการรอดตายร้อยละ 80-90

มโนชย์ จงรักวิทย์ (2539) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้หน่ออ่อนที่มีอายุประมาณ 1-3 เดือน ชักนำให้เกิดยอดใหม่บนอาหารสังเคราะห์ 4 สูตร คือ สูตร MS สูตร MS ดัดแปลง สูตร 1/2 MS และสูตร N6 ที่เติม BA 4 ระดับ ความเข้มข้นคือ 0 5 10 และ 50 ไมโครโมลต่อลิตร ในสภาพรับแสง 16 ชั่วโมงต่อรอบวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าสูตร MS ที่เติม BA 50 ไมโครโมลต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดจำนวนสูงสุด 29.7 ยอดต่อชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง เมื่อนำช่อดอกอ่อนของหญ้าแฝกหอมแหล่งพันธุ์อินโดนีเซียมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์ สูตร N6 ที่เติม 2,4-D หรือ 3,6-dichloro-O-anisic (dicamba) ที่ 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0 5 10 15 และ 30 ไมโครโมลต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืดและสภาพรับแสง ในสภาพมืด 2,4-D ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงสุด 95.20 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสภาพรับแสง 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 68.00 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพมืด แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะของเซลล์เกาะตัวกันแน่นในปริมาณมากกว่าลักษณะของเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ แต่ในสภาพรับแสงผลที่ได้กลับตรงกันข้าม ในขณะที่เมื่อใช้ dicamba ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลต่อลิตรในสภาพมืด สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 77.60 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสภาพรับแสงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเป็น 40.10 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพรับแสงแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะของเซลล์เกาะตัวกันแน่นในปริมาณมากกว่าเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ เมื่อนำแคลลัสที่มีลักษณะของเซลล์เกาะตัวกันแน่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 ซม. มาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ บนอาหารสังเคราะห์สูตร N6 ที่เติม 2,4-D 4 ระดับความเข้มข้นคือ 0.00 0.50 1.00 และ 5.00 ไมโครโมลต่อลิตร ร่วมกับ 6-furfurylaminopurine (kinetin) 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0.00 0.50 และ 1.00 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ โดยเฉพาะในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพรับแสง สามารถชักนำให้เกิดต้นสูงสุด 5 ต้นต่อแคลลัส เมื่อเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาน 4 สัปดาห์ เมื่อนำยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS ที่เติม IBA หรือ NAA 4 ระดับความเข้มข้นคือ 0.00 0.50 1.00 และ 5.00 ไมโครโมลต่อลิตร ในสภาพรับแสงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า IBA ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลต่อลิตรและ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงสุด

น้องนุช พจน์ชัยกุล และคณะ (2542) ทำการเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนหน่ออ่อนหญ้าแพรกหินที่ระยะต่างกันคือ หน่ออ่อนที่มีความสูง 1-3 นิ้ว กับหน่อที่มีความสูงมากกว่า 3 นิ้ว โดยนำใบจากหน่ออ่อนมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.50 เซนติเมตร ตั้งแต่โคนใบขึ้นไป 3 ชิ้น เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ในอัตราส่วน 1:0 1:1 1:2 2:0 และ 2:1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด พบว่าใบของหน่อที่มีขนาด 1-3 นิ้วเท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี และเนื้อเยื่อส่วนที่ 1 และ 2 (ใกล้โคนใบ) จะให้ปริมาณแคลลัสมากกว่าส่วนที่ 3 สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA:BA ในอัตราส่วน 2:1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA:BA ในอัตราส่วน 1:2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้นได้

รัชดา ไชยเจริญ และคณะ (2543) ศึกษาผลของ 2,4-D ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสในเมล็ดหญ้าปากควาย พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าแคลลัสที่เกาะตัวกันแน่นต่อแคลลัสที่เกิดขึ้นทั้งหมดสูงสุด

Marco *et al.* (1993) ทำการศึกษาพบว่าใบของหญ้าแฝกสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5.7 ไมโครโมลาร์ และ kinetin ความเข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ เมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากภายในเวลาเพียง 14 วัน

Ruth *et al.* (2000) ศึกษาการใช้ส่วนรากที่เกาะตัวกันแน่น (crown) และใบในสภาพปลอดเชื้อ ของหญ้าแฝกมาชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นใหม่แทนการใช้ส่วนดอกที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย พบว่า ชิ้นส่วนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ และซูโครส 10 กรัมต่อลิตร (75 เปอร์เซ็นต์) ในสภาพมีแสง และแคลลัสดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ และซูโครส 25 กรัมต่อลิตรได้ในระยะเวลาสั้น ๆ (12-18 สัปดาห์)

Prasertsongskun. (2003) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเซลล์แขวนลอยของหญ้าแฝกพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อดอก นำเซลล์แขวนลอยดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ เกิดการสร้างกลุ่มแคลลัสขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เล็ก และเมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถพัฒนาเป็นต้นแฝกที่สมบูรณ์ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ และค้นพบว่าโปรโตพลาสของหญ้าแฝกจะมีการแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุดในอาหารเหลวสูตร N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 3 วัน ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเลี้ยงคือ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (Prasertsongskun. 2004)

Sangduen and Prasertsongskun. (2009) รายงานว่าช่อดอกอ่อนของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อเทียบกับอาหารสูตร N6 ที่เติมฮอร์โมนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และแคลลัสที่ได้สามารถแตกตัวเพิ่มปริมาณได้ดียิ่งขึ้นเมื่อทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติมโพรลีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ นอกจากนี้ยังค้นพบว่า ชนิดของน้ำตาลมีผลต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของหญ้าแฝกสายพันธุ์นี้โดย เมื่อทำการทดสอบการใช้น้ำตาล 2 ชนิดคือ ซอบิทอล และ แมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผลที่ได้คือ น้ำตาลซอบิทอลที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้อัตราการเกิดต้นใหม่สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์

2.3 การถ่ายฝากยีนในพืช (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

การถ่ายฝากยีนในพืชทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งใช้รองรับการถ่ายฝากยีนมีความก้าวหน้ามาก สามารถเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ราก กิ่ง ลำต้น ดอก จนถึงกลุ่มเซลล์และโปรโตพลาสต์ จนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

2.3.1 เทคนิคการถ่ายฝากยีนในพืช มีหลายวิธี ดังนี้

2.3.1.1 การถ่ายฝากยีนโดยตรง (direct gene transfer) การถ่ายยีนจะถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์โดยแยกโปรโตพลาสต์จากพืช แล้วนำมารวมกับสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ ดีเอ็นเอหรือยีนที่จะนำมาถ่ายฝากลงในโปรโตพลาสต์ อาจจะต่ออยู่กับเวคเตอร์ที่เหมาะสม หรือเป็นโครโมโซมทั้งแท่งที่แยกออกมา(สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

2.3.1.2 การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การถ่ายฝากยีนวิธีนี้จะทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยนำโปรโตพลาสต์มาบ่มด้วยสารละลายดีเอ็นเอหรือโครโมโซม แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปเพื่อทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้ดีเอ็นเอแทรกเข้าสู่เซลล์พืช (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

2.3.1.3 การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection) เป็นวิธีการใช้เข็มฉีดยีนเข้าสู่โปรโตพลาสตร์ ในพืชทำได้ยากกว่าในสัตว์ เนื่องจากพืชมีแวคิวโอลซึ่งเป็นที่เก็บเอนไซม์และสารพิษ ต้องระวังไม่ให้ถูกแวคิวโอลแตก เพราะมักจะทำให้เซลล์ตาย (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.4 การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิง (particle gun หรือ microprojectile bombardment หรือ biolistic technique) เป็นวิธีการที่ใช้อนุภาคทังสเตนหรือทองขนาดเล็กเคลือบด้วยดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายเข้าเซลล์ ใส่ลงในเครื่อง ยิงกระสุน อนุภาคที่ใช้จะแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายในและพาดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเข้าไปด้วย สามารถยิงอนุภาคเข้าไปได้เป็นพันอนุภาคในหนึ่งครั้ง ใช้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์โดยไม่ต้องทำเป็น โปรโตพลาสต์ มีผลให้สามารถถ่ายยีนไปยังออร์แกเนลล์โดยตรง เช่นถ่ายยีนไปยังไมโตคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545) Hue *et al.* (2006) ได้ศึกษาการถ่ายโอนยีนโดยใช้เทคนิค particle bombardmend เพื่อนำยีน *bar* ที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชชนิดกลูโฟซิเนตเข้าสู่ส่วนเอมบริโอจินิกแคลลัสของหญ้า wheatgrass สายพันธุ์ลูกผสม พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถถ่ายโอนยีนเข้าสู่ดีเอ็นเอเป้าหมายสู่หญ้า wheatgrass สายพันธุ์ลูกผสม ได้ 1.1 เปอร์เซ็นต์

2.3.1.5 การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียม เป็นแบคทีเรียที่สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชในบริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดลักษณะปุ่มปม หรือก้อนเนื้อในบริเวณนั้น และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สามารถเจริญเติบโตได้ไม่จำกัด โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโต แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens* ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เนื่องจากมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid) ถูกถ่ายทอดเข้าไปและเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T-DNA (transferred DNA) พลาสมิด Ti ที่พบมากมี 2 ชนิด คือชนิดออกโทปีน (octopine) และ โนปาลีน (nopaline) พลาสมิด มีส่วนของ virulence (*vir*) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์ของพืช ภายใน T-DNA จะมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ในบริเวณที่ถูกบุกรุกจะมีการสร้างสารโอปีน (opine) ตามชนิดของ พลาสมิด Ti ส่วนอะโกรแบคทีเรียมก็สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงาน

เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไปพืชก็ยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร นอกจากยีนที่กำหนดการสังเคราะห์สารโอปีนแล้ว ใน T-DNA ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่เป็นสาเหตุให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและไม่จำกัด เป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

ขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำๆ 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) และถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน *vir* ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลไกการถ่ายโอนยีนโดยรวมของอะโกรแบคทีเรียม คล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ conjugation ของแบคทีเรีย โดยกระบวนการส่งถ่ายจะถูกกระตุ้นโดยสารประกอบอะซีโตไซริงโกน (acetosyringone) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน chromosomal virulence (*chv*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และ *vir* gene ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่บน พลาสมิด โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *vir* D แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว ยีนที่อยู่ใน T-DNA ทั้งหมดเหมือนกับยีนของพืช แต่อยู่ในพลาสมิดของแบคทีเรีย ยีนเหล่านี้มีโปรโมเตอร์ (promoter) ของพืช เทอร์มิเนเตอร์ (terminator) และตำแหน่งที่ใช้เติมเบส poly A ที่พบในยูคาริโอต ยีนเหล่านี้จะไม่มีการแสดงออกในเซลล์ของอะโกรแบคทีเรียม แต่แสดงออกในเซลล์ของพืชที่ได้รับ T-DNA(ภาพที่ 2.2) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

การใช้พลาสมิด Ti เป็นเวคเตอร์สำหรับถ่ายฝากยีนให้กับพืชจะทำโดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและสารโอปีนด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อใส่ T-DNA เข้าสู่พืช พืชก็จะได้รับยีนที่สอดใส่ไว้แทน การถ่ายฝากยีนสู่เซลล์พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม ใช้วิธีเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียม ร่วมกับโปรโตพลาสต์ โดยใช้ใบพืชที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือใช้ชิ้นส่วนอื่น ๆ เช่นใบเลี้ยง ก้านใบ ลำต้นอ่อน แคลลัส ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อให้เกิดบาดแผล (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

2.3.2 ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

2.3.2.1 ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene) เป็นยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสามารถใช้ในการคัดเลือก เซลล์พืชที่ได้รับยีนเข้าไปเซลล์นั้นจะมีคุณสมบัติต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกเซลล์ สำหรับการตรวจสอบการถ่ายฝากยีนเครื่องหมายมีหลายชนิด เช่น *hpt* ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และ *NPT* II ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

2.3.2.2 ยีนรายงานผล (reporter gene) เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบได้ว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และแสดงออกได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อส่วนใด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) โดยปกติยีนจะติดอยู่กับไพรเมอร์ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนนี้มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของยีนรายงานผลนั้น ๆ ยีนรายงานผลที่นิยมใช้กันมาก คือ ยีน *gus* จากแบคทีเรีย *E. coli* (β-glucuronidase gene) (ปรีชา ประเทพา. 2543)

2.3.3 การตรวจสอบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

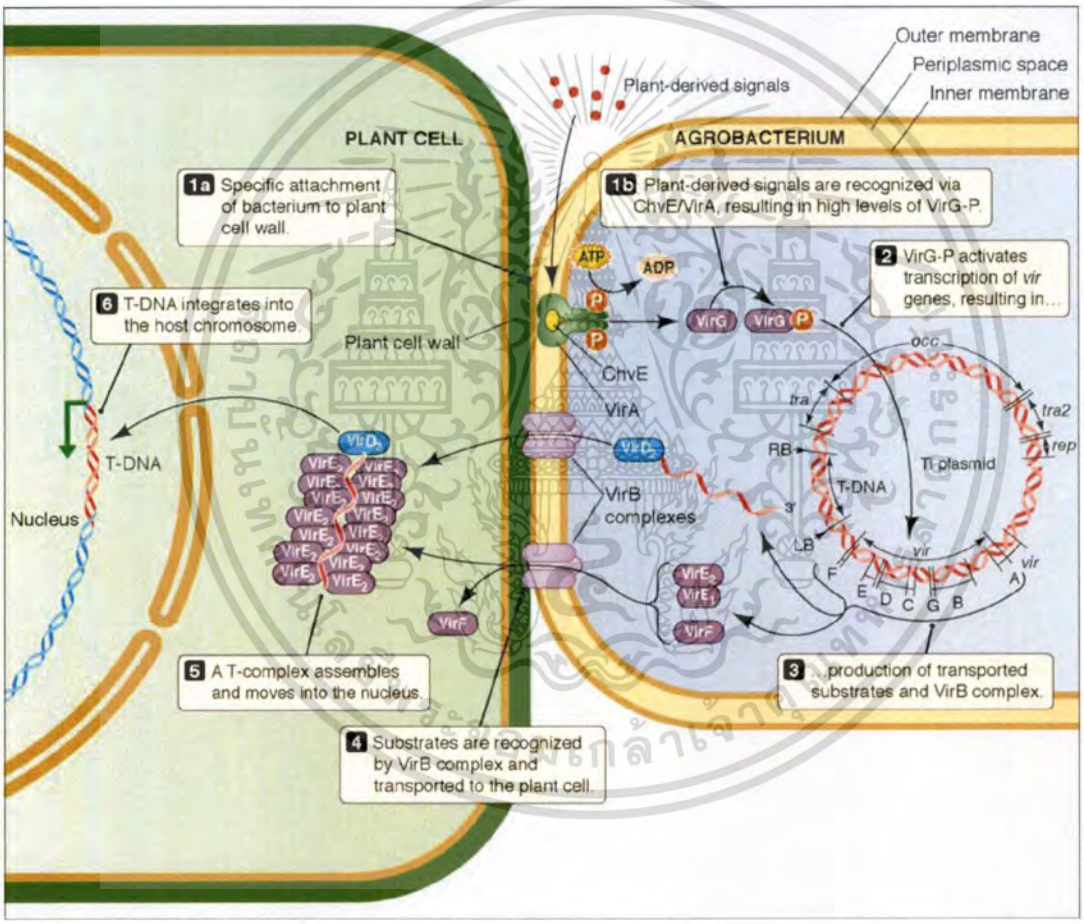
2.3.3.1 การตรวจสอบโดยวิธี gus assay โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาแช่ในสารละลาย X-gluc จากนั้นนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยดูจากการเกิดจุดสีน้ำเงินภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.3.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทำการสกัดดีเอ็นเอจากนั้นหายีนโดยใช้เทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาดชนิดของยีน โดยทั่วไปแล้วการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี คือ ใช้เทคนิค gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกตามขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ บนอกาโรสเจล (agarose gel) หรือ โพลีอคิลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน จากนั้นย้อมชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

nucleic acid hybridization ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจนสามารถนำ PCR ที่ได้ไปตรึงกับแผ่นไนโตรเซลลูโลส หรือไนลอน แล้วมาทำเซาเทอร์นบลอท (southern blot) โดยอาศัยตัวติดตามที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (จริยา ชมวารินทร์ และคณะ. 2540)



ภาพที่ 2.2 แสดงกลไกการส่งถ่าย T-DNA จากเซลล์อะโกรแบคทีเรียมเข้าสู่พืช

ที่มา : Colleen and Andrew. 2006.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันการถ่ายโอนยีนในหญ้าแฝกมีรายงานน้อยมาก แต่พบตัวอย่างการถ่ายโอนยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชตระกูลหญ้าจำนวนมาก ดังนี้

Yu *et al.* (2000) ได้ทดลองการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ creeping bentgrass โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pPZP200 เพื่อหาวิธีที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชตระกูลหญ้าด้วยวิธี microprojectile bombardment และ protoplast electroporation พบว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แคลลัสที่มีอายุ 40 วัน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D, kinetin ดีกว่า 2 เทคนิคที่กล่าวถึงข้างต้น การตรวจสอบโดยดูการเรืองแสงจากคุณสมบัติของยีน *GFP* และการตรวจสอบลักษณะแบนด์ที่เกิดขึ้นภายหลังการทำเซาเทอร์นบลอทมีลักษณะสอดคล้องกับขนาดของยีน *GFP* เป็นการยืนยันได้ว่าต้นที่ได้เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน แสดงให้เห็นว่า การถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม ประสบความสำเร็จในการประยุกต์ใช้กับ creeping bentgrass

รัตนา ขามฤทธิ์ และคณะ (2549) ได้ทำการทดลอง การส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อยโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียม ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสร่วมกับเชื้อ อะโกรแบคทีเรียม คือ 90 นาที เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้วิธี gus assay พบการแสดงออกของยีน *gus* ในส่วนของแคลลัสอ้อยที่ผ่านการคัดเลือก

Shweta and Suresh. (2003) ศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ buffel grass โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ทดสอบผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ และผลของอะซีโตไซริงโกนต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อที่เหมาะสม คือ 30 นาทีและการเติมอะซีโตไซริงโกน (ความเข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์) มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในกรถ่ายโอนยีนได้ (63.30 เปอร์เซ็นต์)

Han *et al.* (2005) ศึกษาพัฒนาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ creeping bentgrass โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 ทดสอบการทำ preculture โดยนำชิ้นส่วนแคลลัสแช่ในอะซีโตไซริงโกนความเข้มข้น 100 ไมโครโมล ก่อนการทำให้ติดเชื้อ (infect) ด้วยอะโกรแบคทีเรียม พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนได้ และนอกจากนี้การ sonicate ในช่วงการ co-cultivation ร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมที่ระยะเวลา 15 และ 30 นาที พบว่าการ sonicate ที่ระยะเวลาสั้น ๆ (15 นาที) มีผลต่อการลดการแสดงออกของยีน *gus* ในขณะที่การ sonicate ที่ระยะเวลานานขึ้น (30 นาที) มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน *gus*

Zeng and Yaxin. (2005) รายงานว่าการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะเวคเตอร์ pCAMBIA มีความเหมาะสมในการถ่ายโอนยีนมากกว่าการใช้เวคเตอร์ pTOK 233 เมื่อทำการทดลองในหญ้ากลุ่ม tall fescue โดยเวคเตอร์ pCAMBIA ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเฉลี่ย 5.60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เวคเตอร์ pTOK233 ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเฉลี่ย 4.60 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee *et al.* (2006) ศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เอมบริโอจินิกแคลลัสของ orchardgrass โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA101, GV3101 และ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pIG121Hm และเพิ่มการเติม อะซีโตไซริงโกน ในขั้น inoculation และ co-cultivation พบว่าสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนดีที่สุด คือ EHA101 รองลงมา คือ GV3101 และ LBA4404 ตามลำดับสารอะซีโตไซริงโกนมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน *gus* เห็นได้จากเมื่อเติม อะซีโตไซริงโกน 200 ไมโครโมลาร์ในขั้นตอนการ inoculation และ co-cultivation จะส่งผลให้ยีน *gus* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในส่วนของเนื้อเยื่อแคลลัสที่ทำการถ่ายยีน 16.00-56.10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์และเซาเทอร์นบลอท พบว่ามียีนเป้าหมายปรากฏอยู่ในต้นพืชที่ทำการทดลองจำนวน 1 หรือ 2 โคลน ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน 4.80 เปอร์เซ็นต์

Arockiasamy and Ignacimuthu (2007) ศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าว 2 สายพันธุ์ คือ White Ponni และ Pusa Basmathi 1 โดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอด และอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pRIT1 พบว่าชิ้นส่วนช่อดอกอายุ 4 วัน เหมาะสมในการใช้ถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าวเมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gus histochemical assay ให้ผลในการถ่ายโอนยีน 5.60-6.20 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ White Ponni และ 7.00-8.00 เปอร์เซ็นต์ในสายพันธุ์ Pusa Basmathi 1

Ge *et al.* (2007) เปรียบเทียบเวคเตอร์ที่เหมาะสมต่อการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ darnel ryegrass พลาสมิดที่นำมาทดสอบคือ pCAMBIA1301 และ pCAMBIA1305.2 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม strain EHA105 เป็นพาหะ พบว่า pCAMBIA1301 และ pCAMBIA1305.2 มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนคิดเป็นร้อยละ 4.80 และ 4.50 ตามลำดับ

Yaxin *et al.* (2007) ศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Lolium temulentum* โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 และ pCAMBIA1305.2 เพื่อใช้เป็นพืชต้นแบบในการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่หญ้าในกลุ่ม turf grass จากการศึกษาพบว่า การเติมอะซีโตไซริงโกนในขั้นตอนการเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ช่วยเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเมื่อเทียบกับชิ้นส่วนที่ไม่มีการใช้อะซีโตไซริงโกน (10.00-12.50 เปอร์เซ็นต์ และ 5.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์การถ่ายโอนยีนที่ประสบความสำเร็จคิดเป็น 4.80 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้เวคเตอร์ pCAMBIA1301 และ4.50 เปอร์เซ็นต์ในเวคเตอร์ pCAMBIA1305.2

Daniel *et al.* (2008) ทดสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่หญ้าพันธุ์ *Brachypodium distachyn* L. โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีเวคเตอร์ pDM805 โดยการ pre-culture ชิ้นส่วนก่อนการเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ทำการทดสอบเป็นเวลา 58 วัน พบว่าการ pre-culture ชิ้นส่วนในอาหารเป็นเวลา 17 วัน ให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนได้ดีที่สุด 55 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนจะลดลงตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการ pre-culture ชิ้นส่วนเป็นการช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ โดยเป็นช่วงที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์เพื่อขยายขนาดของเซลล์ ทำให้ง่ายต่อการเคลื่อนย้ายของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช

Yang *et al.* (2008) ศึกษาการถ่ายโอนยีนด้านความหนาวเย็นเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (strain EHA105) ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301ในการถ่ายโอนยีนโดยใช้ชิ้นส่วนบริเวณตาข้าง และ ตาพิเศษ ของหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อมาชักนำให้เกิดคัพภะ โดยผ่านกระบวนการเอมบริโอเจนเนซีส และเกิดเป็นต้นใหม่ แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA พบว่าฮอร์โมนดังกล่าว มีผลต่อการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ในการถ่ายโอนยีนมีแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก 18 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายแคลลัสดังกล่าวลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ พบว่าเอมบริโอเจนนิกแคลลัส มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่คิดเป็นร้อยละ 80

Yajun *et al.* (2009) ศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ switchgrass โดยดูชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมในการถ่ายโอนยีน พบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แคลลัสที่ได้จากส่วนผล (caryopses) เนื่องจากให้ผลในการเกิดแคลลัสในลักษณะเอมบริโอจินิกแคลลัส จึงมีโอกาสในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี อีกทั้งยังส่งผลถึงลักษณะที่แสดงออกของต้นที่ได้ที่จะคงที่ไม่ค่อยมีความแปรปรวนเมื่อเทียบกับแคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยใช้ชิ้นส่วนอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

110388

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชทดลอง

หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี (*Vetiveria zizanioides* Nash.)

หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี (*Vetiveria nemoralis* A. Camus)

3.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้

อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ภายในบรรจุพลาสมิด pBI121

อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ภายในบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1301

อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่ภายในบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1301

3.3 อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow BHA48; FASTER®, Netherlands.)
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (TOMY SX-500; TOMY®, Japan.)
3. เครื่องชั่งอิเล็กโทรนิค (AG204; METTLER TOLEDO®, Switzerland.)
4. เครื่องปรับค่าความเป็นกรดด่าง (Cyberscan PC510; EUTECH®, Thailand.)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VISIBLE Spectrophotometer; SHIMADZU®, Australia)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (SPECTRAFUGE 16M; Labnet®, USA.)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (MIKRO 22R Microcentrifuge; HETTICH®, Germany.)
8. ไมโครเวฟ (Microwave oven M13; Sumsung®, Thailand.)
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 ° C (ULTRA-LOW TEMPERATURE FREEZER; SANYO®, Japan)
10. เครื่องเพิ่มปริมาณสาร DNA (Master cycler; Mondo Tech®, Thailand.)
11. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis; Lab Net®, USA.)
12. เครื่องถ่ายรูปเจล (Gene Snap; SYNGENE®, Japan)
13. Water Bath (DI N40050; Memmert®, Germany.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. เครื่องเขย่า (Innova 2000; New BRUNWICK SCIENTIFIC®, Thailand.)

15. กล้องถ่ายรูป (Samsung ST550; SAMSUNG, Korea)

16. ห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และ ชั้นมืด

17. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่นๆ เช่น บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร ปิเปต กระบอกตวง ขวดแก้วบรรจุอาหารขนาด 4 ออนซ์พร้อมฝาปิด จานเลี้ยงเชื้อ ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง มีดผ่าตัด ปากคีบ กรรไกร ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย potassium hydroxide (KOH) และ hydrochloric acid (HCl)

2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร LB (Sambrook and Russel. 2001) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย sodium hydroxide (NaOH) และ hydrochloric acid (HCl)

3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตรAAM (Toriyama and Hinata. 1985) ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วย potassium hydroxide (KOH) และ hydrochloric acid (HCl)

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA BA และ 2,4-D

5 ยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ไฮโกรมัยซิน และซีโฟแทกซีม

6. อะซีโตไซริงโกน

7. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด genomic DNA จากพืช

8. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ DNA โดยวิธีแยกขนาด DNA ในเจลอะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

9. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ของบริษัท Invitrogen® และ บริษัท RBC®

10. สารเคมีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gus histochemical assay

หมายเหตุ : รายละเอียดและการเตรียมอยู่ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการ

3.5.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.5.1.1 การทดลองที่ 1.1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์

นำชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สุราษฎร์ธานี และพันธุ์ราชบุรี ในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (น้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในสภาวะมืด เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและบันทึกผล เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส ลักษณะการเกาะตัวของแคลลัส และสีของแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in complete randomized design ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ๆ ละ 4 ชิ้นส่วน มี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือ สูตรอาหารมี 2 สูตร คือ

A1 = อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (น้องนุช พจน์ชัยกุล และคณะ. 2542)

A2 = อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Yang *et al.* 2008)

ปัจจัย B คือ สายพันธุ์หญ้าแฝก มี 2 สายพันธุ์ คือ

B1 = หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี

B2 = หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี

วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT)

3.5.1.2 การทดลองที่ 1.2 ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

เลี้ยงแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1.1 ของหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารสูตร MS ปกติที่เติมสารควบคุมการเจริญที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในสภาวะให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง และบันทึกผล เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอด จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดราก วางแผนการทดลองแบบ 5 x 2 Factorial in complete randomized design ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ ๆ ละ 4 ชิ้นส่วน มี 2 ปัจจัยดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัย A คือ สูตรอาหาร มี 5 สูตร คือ

A1 = อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

A2 = อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

A3 = อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

A4 = อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

A5 = อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัย B คือ สายพันธุ์หญ้าแฝก มี 2 สายพันธุ์ คือ

B1 = หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี

B2 = หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี

วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT)

3.5.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

3.5.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

เลี้ยงอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 และอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 หรือ pBI121 ในอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมที่ได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมแต่เพิ่มปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน ดูดสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในอาหาร AAM (Toriyama and Hinata. 1985) ที่เติมอะซีโตไซริงโกนความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 แบ่งแคลลัสที่ได้จากการชักนำชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าแฝกเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จุ่มแคลลัสลงในสารแขวนลอยของอะโกรแบคทีเรียม เขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (สูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1) เลี้ยงในสภาวะมืด เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นที่เติมซีโฟแทกซีม 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซับแคลลัสให้แห้ง และย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอด (สูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.2) ที่เติมซีโฟแทกซีม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้นบันทึกผลการทดลองที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในกรณีที่ใช้เวคเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pBI121) และสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในกรณีที่ใช้เวคเตอร์ pCAMBIA1301) ที่ระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดที่ทำการทดลอง พบว่าพืชปกติไม่สามารถเจริญได้ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์(ไม่แสดงผลการทดลอง) ในสภาพที่มีแสง ตรวจสอบและบันทึกผลทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3.5.2.2 ขั้นตอนที่ 2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus*

นำต้นของหญ้าแฝกที่ผ่านการถ่ายโอนยีน มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี Gus histochemical assay โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแช่ในสารละลาย x-gluc ซึ่งเป็นซับเตรตของเอนไซม์ β-glucuronidase บ่มในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบการเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนหญ้าแฝก(ภาคผนวก ข.)

3.5.2.3 ขั้นตอนที่ 3 การตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction : PCR

สกัดดีเอ็นเอจากหญ้าแฝก ตามวิธีการของ กนกพร สมพรไพลิน (2005) ดังนี้

ตัดชิ้นส่วนหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อน้ำหนักประมาณ 50-100 มิลลิกรัม (ใส่ในหลอดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร) บดชิ้นส่วนให้ละเอียด เติมสารสกัดดีเอ็นเอ และสารผสม phenol/chloroform/isoamyl alcohol อย่างละ 450 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม เอทธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในหลอด กลับหลอดไปมาประมาณ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เทสารละลายส่วนใส ทิ้งให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer จากนั้นทำลายอาร์เอ็นเอ โดยการเติมเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที

ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR

ทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหญ้าแฝก 1 ไมโครลิตรเติม 10x Taq buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ที่มีความจำเพาะกับโปรโมเตอร์ CaMV35S คือไพรเมอร์ส่วนฟอร์เวิร์ด TGCGAAGGATAGTGGGATTGTGC และไพรเมอร์ส่วนรีเวิร์ส GGATTGATGTGAACATGGTGGAG สำหรับ เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ 35S ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร 3 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Tag DNA polymerase ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องพีซีอาร์ของ EPPENDORF รุ่น MASTER CYCLER EP GRADIENTS โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Predenaturation	ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	
	3 step cycling	
Denaturation	ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	35 รอบ
Annealing	ที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	
Final extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที	

ตรวจสอบผลพีซีอาร์ ที่ได้โดยทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส 1.0 % ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์

จากการทดลองการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตาข้างหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรี บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี บนอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ผลการเกิดแคลลัส 82.50 เปอร์เซ็นต์ และ 5.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารทั้ง 2 สูตร มีสีขาวอมเหลือง ลักษณะเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (friable callus) (ภาพที่ 4.1ก) ในขณะที่หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี อาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุดคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 61.25 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง MS ที่เติม NAA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 15.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) สีของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารทั้ง 2 สูตรมีสีขาวเซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact callus) (ภาพที่ 4.1ข) สายพันธุ์หญ้าแฝกและสูตรอาหารส่งผลร่วมกันในการชักนำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด

การเลี้ยงแคลลัสของหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองที่ 1.1 บนอาหารสูตร MS ปกติที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับในที่มีแสงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอด ปรากฏผลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด

จากการทดลองพบว่าแคลลัสของหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรมีการพัฒนาเกิดจุดเขียวภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.2 ก. และค.)และเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปอีก 2 สัปดาห์มีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.2 ข. และง.) ในสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี สูตรอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดต้นสูงสุด 80.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.75 0.50 0.25 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้การเกิดยอด 67.50 65.00 62.50 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่สายพันธุ์ราชบุรีอาหารที่มีผลให้เปอร์เซ็นต์ในการเกิดยอดสูงสุด คือ อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร การเกิดยอดสูงสุด 15.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.50 1.00 0.25 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้การเกิดยอด 12.50 10.00 7.50 และ 5.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) สูตรอาหารแต่ละสูตรที่ทำการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อการพัฒนาของยอดในหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ของหญ้าแฝกเป็นปัจจัยหลักต่อการพัฒนาของยอดในสูตรอาหารดังกล่าวโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

4.1.2.2 จำนวนยอดต่อแคลลัส

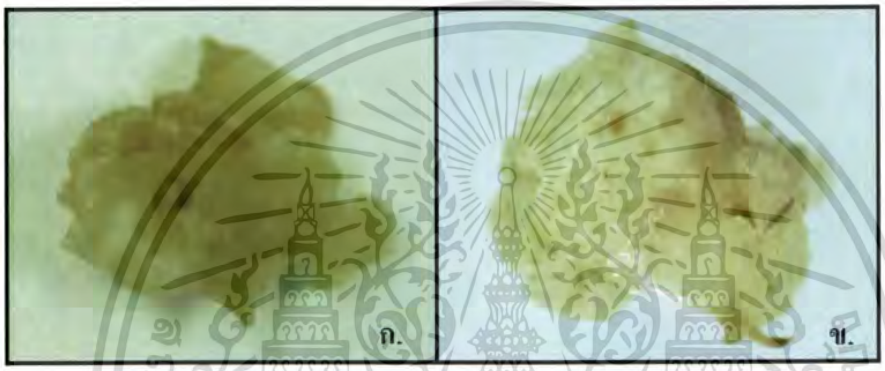
จากการทดลอง พบว่า อาหารที่ใช้ในการทดลองมีความเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีมากกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ราชบุรี และแต่ละสูตรอาหารให้ผลการการเกิดยอดต่อแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ จำนวนยอดที่ตรวจนับได้ในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด เท่ากับ 9.59 ยอดต่อแคลลัส รองลงมาคือ อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.75 0.50 0.25 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลให้ จำนวนยอดต่อแคลลัสเท่ากับ 8.57 8.16 8.00 และ 7.04 ยอดต่อแคลลัสตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)ในขณะที่แคลลัสของหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการเกิดยอดสูงสุด 2.50 ยอดต่อแคลลัส รองลงมาคือ อาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.50 0.00 0.25 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลให้ จำนวนยอดต่อแคลลัสเท่ากับ 1.90 1.40 1.20 และ 1.10 ยอดต่อแคลลัส ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

4.1.2.3 ความยาวยอด

จากผลการทดลอง พบว่าอาหารที่ใช้ในการทดลองมีความเหมาะสมต่อการเจริญของความยาวยอดหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี ในแต่ละสูตรอาหารให้ผลต่อความยาวยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ความยาวยอดที่ตรวจวัดได้ในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาว

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยอดสูงสุดวัดได้ 0.64 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.50 0.25 0.75 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีความยาวยอดเท่ากับ 0.63 0.63 0.61 และ 0.59 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)ในขณะที่ในสายพันธุ์ราชบุรีอาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดสูงสุดวัดได้ 0.65 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารสูตรที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.00 0.00 0.50 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความยาวยอดเท่ากับ 0.62 0.59 0.59 และ 0.58 เซนติเมตร ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.3)



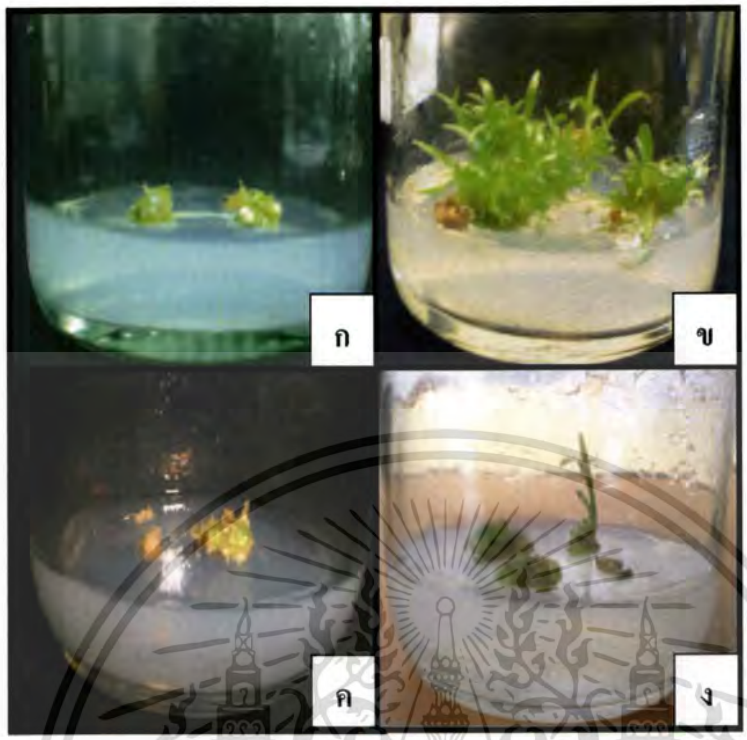
ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะแคลลัสหญ้าแฝกที่ชักนำจากชิ้นส่วนตาข้างที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์
ก. แคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
ข. แคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนตาข้างของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรี ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส[1/] (เปอร์เซ็นต์)		ลักษณะการเกาะตัวของแคลลัส		ลักษณะสีของแคลลัส	
	สายพันธุ์ สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ ราชบุรี	สายพันธุ์ สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ ราชบุรี	สายพันธุ์ สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ ราชบุรี
อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.00 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	82.50±0.81a	15.00±0.90c	เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ	เซลล์เกาะตัวกันแน่น	สีขาวอมเหลือง	สีขาว
อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.00 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	5.00±0.74d	61.25±0.72b	เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ	เซลล์เกาะตัวกันแน่น	สีขาวอมเหลือง	สีขาว

1/ ตัวเลขในตารางที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งและแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan'new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 แสดงการพัฒนาของยอดหญ้าแฝกจากชิ้นส่วนแคลลัส

ก. ลักษณะการเกิดจุดเขียวหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

ข. ยอดหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

ค. ลักษณะการเกิดจุดเขียวหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

ง. ยอดหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5 ระดับความเข้มข้นร่วมกับ BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีต่อการชักนำแคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรีให้พัฒนาเป็นยอด ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (แคลลัส)		จำนวนแคลลัสที่เกิดต้น (แคลลัส)		จำนวนการเกิดต้น (เปอร์เซ็นต์)[1/]	
	สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ราชบุรี	สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ราชบุรี	สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ราชบุรี
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	40	24	2	60.00±0.44a	5.00±0.89b
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	40	25	3	62.50±.03a	7.50±0.08b
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	40	26	5	65.00±0.87a	12.50±0.68b
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	40	27	6	67.50±0.67a	15.00±0.48b
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	40	40	32	4	80.00±0.71a	10.00±0.91b

1/ ตัวเลขในตารางที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งและแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan'new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5 ระดับความเข้มข้นร่วมกับ BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีต่อจำนวนยอดต่อแคลลัสและความยาวยอดของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรี ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนยอดต่อแคลลัส (ยอด)[1/]		ความยาวยอด (เซนติเมตร)[1/]	
	สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ราชบุรี	สายพันธุ์สุราษฎร์ธานี	สายพันธุ์ราชบุรี
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร	7.04±0.88a	1.40±0.10b	0.59±0.22a	0.59±0.25a
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	8.00±0.26a	1.20±0.99b	0.63±0.07a	0.58±0.28a
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร	8.16±0.95a	1.90±0.64b	0.63±0.08a	0.59±0.31a
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร	8.57±0.78a	2.50±0.31b	0.61±0.06a	0.65±0.34a
อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	9.59±0.72a	1.10±0.52b	0.64±0.07a	0.62±0.32a

1/ ตัวเลขในตารางที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งและแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ Duncan'new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

4.2.1 ผลของการพัฒนาเป็นต้นใหม่ภายหลังการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ภายหลังการเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และสายพันธุ์ราชบุรี ร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA1301 และเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 พบว่า แคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่เฉลี่ย 115 106 และ 59.5 ต้น ภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 หรือ pBI121 และ เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 4-6 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.3ง. จ. และฉ.)ในขณะที่หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีเมื่อทำการเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA1301 แคลลัสมีการพัฒนาในระยะแรกแคลลัสบางส่วนเกิดจุดเขียว และตายภายในเวลา 2 สัปดาห์(ภาพที่ 4.3ก. และข. และตารางที่ 4.5) และเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 แคลลัสยังคงรอดชีวิตบนอาหารทดลองในระยะแรก แต่เมื่อผ่านไปประมาณ 2 สัปดาห์แคลลัสจะมีสีม่วง และไม่มีการพัฒนาของยอดเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.3ค. และตารางที่ 4.5)

4.2.2 ผลของหญ้าแฝกที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอเมื่อทำการคัดเลือกบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ

เมื่อนำต้นเดี่ยวหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ได้ไปคัดเลือกในอาหารสูตร MS ปกติที่เติมยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีหญ้าแฝกที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าว โดยต้นที่ได้จากการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 มีต้นที่รอดชีวิตคิดเป็น 9.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการคัดเลือกในอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.4ค. และง. และตารางที่ 4.4) รองลงมา คือต้นที่ได้จากการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 มีต้นที่รอดชีวิตคิดเป็น 6.28 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการคัดเลือกในอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร(ภาพที่ 4.4ก. และข. และตารางที่ 4.4) ส่วนต้นที่ได้จากการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA1301 ไม่พบต้นที่รอดชีวิตภายหลังการคัดเลือกบนอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4)

4.2.3 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gus assay

จากการทดลองเมื่อนำหญ้าแฝกที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยใช้เทคนิค gus assay พบว่า มีการติดสีน้ำเงินจาง ๆ บริเวณชิ้นส่วนใบพืช (ภาพที่ 4.5ข.) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นหญ้าแฝกปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่จะไม่

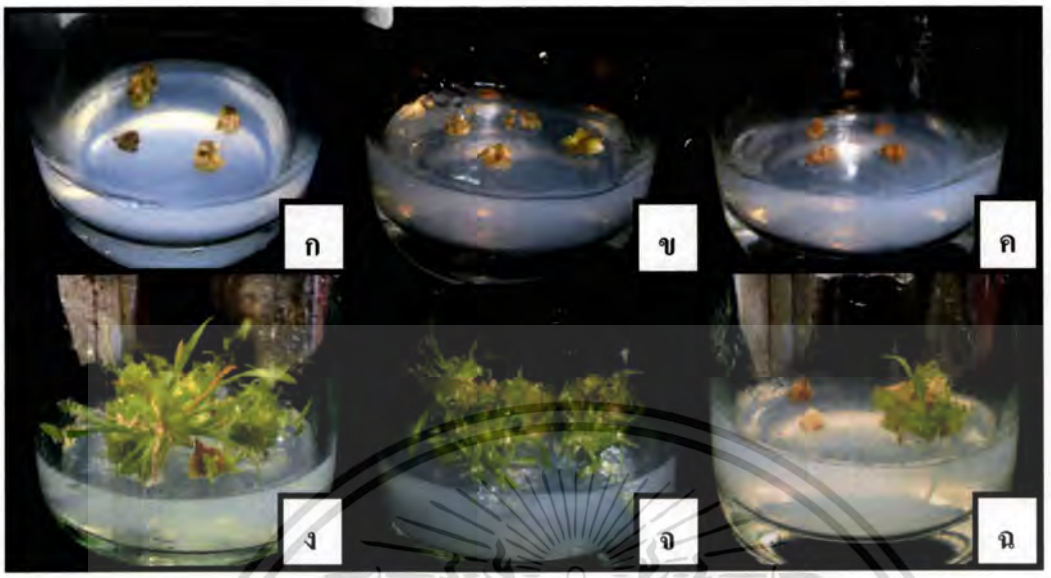
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏสีน้ำเงินเกิดขึ้นเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์(ภาพที่ 4.5ก.)ในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ผ่านการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301

4.2.4 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction : PCR

จากการทดลองเมื่อนำหญ้าแฝกที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะมาทำการตรวจสอบการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ 35S พบว่า หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 สภาวะที่ใช้ในการทดลองมีความเหมาะสมในการถ่ายโอนดีเอ็นเอมากที่สุด คิดเป็น 5.45 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6) แต่ในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์นี้โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 และการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีที่ใช้สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียมและเวคเตอร์ในการทดลองนี้ต้องทำการศึกษาวิธีและสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายโอนดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

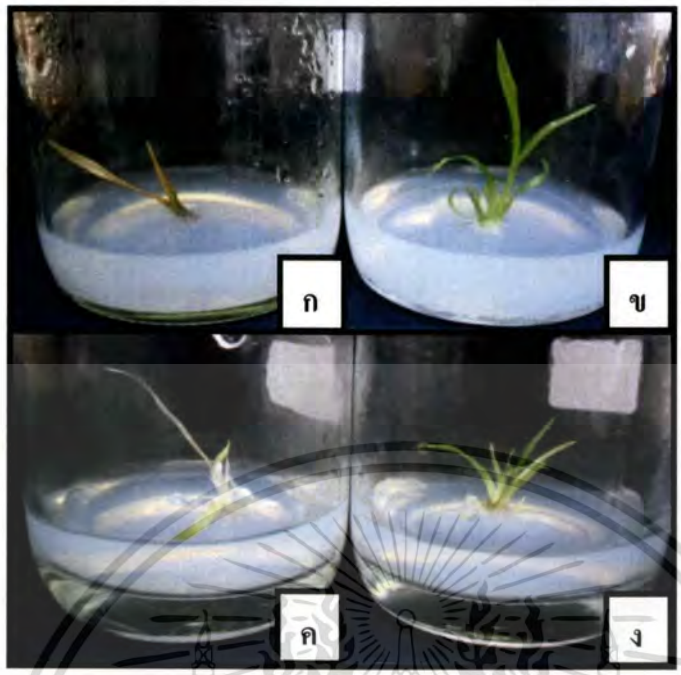


ภาพที่ 4.3 แสดงแคลลัสหญ้าแฝกที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

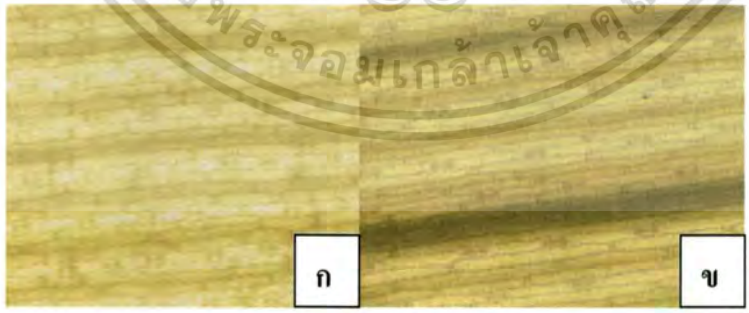
ภาพบน แคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301(ก.), อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121(ข.) และอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301(ค.)ที่เจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพล่าง แคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301(ง.), อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121(จ.) และอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301(ฉ.)ที่เจริญบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่เจริญบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ต้นหญ้าแฝกการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 เลี้ยงบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก. และข.) และหญ้าแฝกที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 เลี้ยงบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค. และง.)

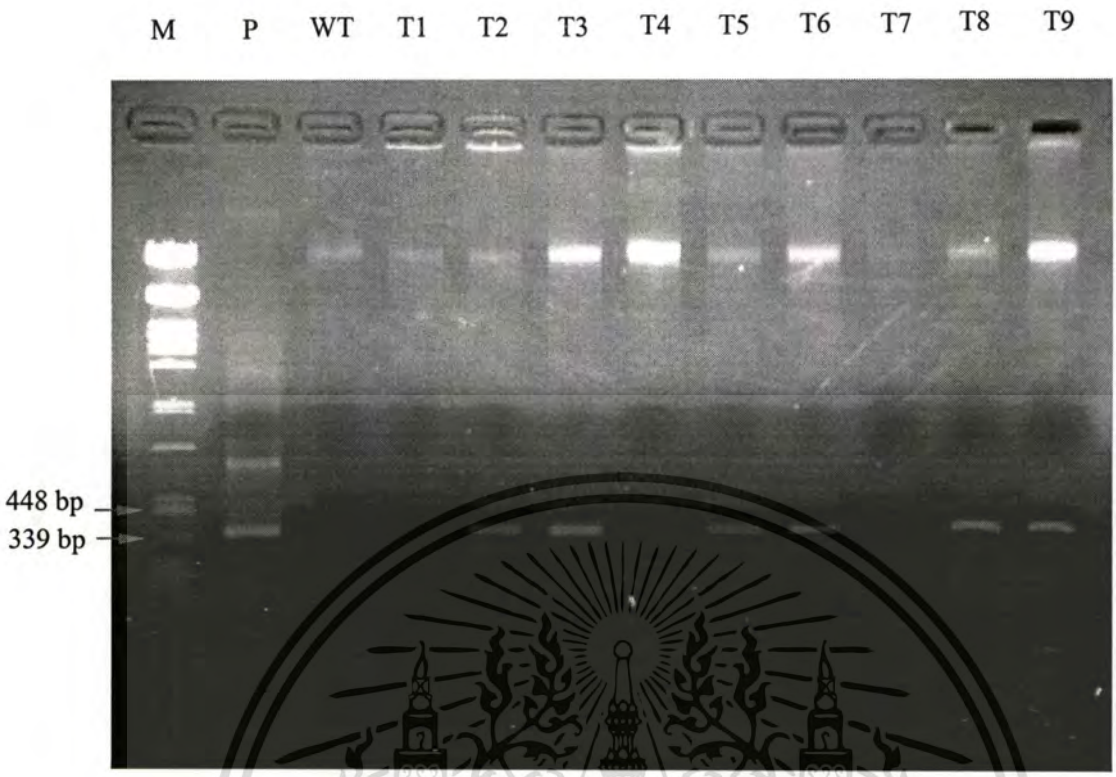


ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Gus assay

ก. ชิ้นส่วนใบหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

ข. ชิ้นส่วนใบหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ CaMV35S ขนาด 376 คู่เบส

M คือ marker λPStI

P คือ ดีเอ็นเอของพลาสมิด pCAMBIA1301

WT คือ ดีเอ็นเอของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

T1-T9 คือ ดีเอ็นเอของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA131 และ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิด		จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (แคลลัส)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (แคลลัส)	จำนวนต้น (ต้น)	จำนวนต้นที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน	เปอร์เซ็นต์การถ่ายโอนยีน (%)
LBA4404 (pBI121)[1/]	ครั้งที่ 1	50	24	129	24	18.60	0.00	0.00
	ครั้งที่ 2	50	18	83	0	0.00	0.00	0.00
LBA4404 (pCAMBIA1301)[2/]	ครั้งที่ 1	50	40	120	5	4.17	0.00	0.00
	ครั้งที่ 2	60	45	110	9	8.18	6.00	5.45
EHA105 (pCAMBIA1301)[2/]	ครั้งที่ 1	50	22	51	0	0.00	0.00	0.00
	ครั้งที่ 2	50	26	68	0	0.00	0.00	0.00

1/ พลาสมิด pBI121 ใช้ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

2/ พลาสมิด pCAMBIA1301 ใช้ยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 4.5 ผลการศึกษาการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA131 และ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิด		จำนวนแคลลัสเริ่มต้น (แคลลัส)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว (แคลลัส)	จำนวนต้น (ต้น)	จำนวนต้นที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน	เปอร์เซ็นต์การถ่ายโอนยีน (%)
LBA4404 (pBI121)[1/]	ครั้งที่ 1	40	10	0	0	0	0	0
	ครั้งที่ 2	50	13	0	0	0	0	0
LBA4404 (pCAMBIA1301)[2/]	ครั้งที่ 1	40	14	0	0	0	0	0
	ครั้งที่ 2	50	18	0	0	0	0	0
EHA105 (pCAMBIA1301)[2/]	ครั้งที่ 1	40	0	0	0	0	0	0
	ครั้งที่ 2	50	10	0	0	0	0	0

1/ พลาสมิด pBI121 ใช้ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

2/ พลาสมิด pCAMBIA1301 ใช้ยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5.1.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรี พบว่าในสภาวะที่ทำการทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัสสูงสุด 82.50 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของน้องนุช พจน์ชัยกุล และคณะ. (2542) ที่ทำการทดลองโดยใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนของหญ้าแพรกหิน ถึงแม้ว่าในการทดลองอื่นๆ ที่ผ่านมาในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เมื่อใช้ช่อดอกอ่อน (มโนชย์ จงรักวิทย์. 2539 ; Prasertsongskun. 2003 ; Sangduen and Prasertsongskun. 2009) ใบ (Marco *et al.* 1993) และ ราก (Ruth *et al.* 2000) เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น ในขณะที่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส คืออาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัสสูงสุด 61.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในหญ้าแฝก และพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด เช่น หญ้าปากควาย (รัชดา ไชยเจริญ และคณะ. 2543) หญ้า Italian rye (Lee *et al.* 2009) หญ้า Chinese leymus (Lui *et al.* 2004) หญ้า Burmuda (Jain *et al.* 2005) และหญ้า Buffel (Columba *et al.* 2006) การพัฒนาของแคลลัสจะสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (NAA และ 2,4-D) และไซโตไคนิน (BA) ในระดับที่เหมาะสม โดยส่งผลต่อการพัฒนาของเอมบริโอจินิกแคลลัส ช่วยสนับสนุนการแบ่งเซลล์ (cell division) (Milka and Thomas. 1998) นอกจากปัจจัยในด้านระดับและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้แล้ว สายพันธุ์ และชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองก็มีผลต่อการพัฒนาเป็นแคลลัสที่ได้แตกต่างกัน (Roberta. 2000) ดังผลที่แสดงในหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

จากการศึกษาในหญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตรมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงสุดคิดเป็น 80.00 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดต่อแคลลัสในปริมาณมาก สอดคล้องกับการทดลองของ น้องนุช พจน์ชัยกุล และคณะ. (2542) ที่ทำการทดลองในหญ้าแพรกหิน ในขณะที่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาของยอดคิดเป็น 15.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ สุราษฎร์ธานี และเมื่อทำการเพิ่มระดับความเข้มข้นของ NAA ให้สูงขึ้น (1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งผลต่อจำนวนการพัฒนาเป็นต้นใหม่ลดลงทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการใช้ฮอร์โมน 2,4-D ในช่วงการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ เช่นเดียวกับการทดลองในหญ้า Chinese leymus ที่มีการใช้ 2,4-D ในช่วงการชักนำให้เกิดแคลลัส และประสบผลสำเร็จให้แคลลัสในปริมาณมาก แต่เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดยอดจะประสบความสำเร็จค่อนข้างต่ำในบางสายพันธุ์ของหญ้าชนิดนี้ (Lui *et al.* 2004) ทั้งนี้การตอบสนองดังกล่าวในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีอาจมีผลเนื่องมาจากการสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินภายในเซลล์ที่มีในปริมาณสูง และเมื่อได้รับสารดังกล่าวจากภายนอกเพิ่มเข้าไป จึงอาจส่งผลยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ แทนการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ (Leyser. 1998) ถึงแม้ว่าโดยปกติเชื่อว่า 2,4-D มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการเอมบริโอจินีซิสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลหญ้า และประสบความสำเร็จสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่จากส่วนของแคลลัสที่ได้ (Ward and Jodan. 2001; Satyavathi *et al.* 2004)ในการทดลองที่ผ่านมามีรายงานว่าการใช้ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชตระกูลหญ้าหลายชนิดจะไม่ประสบปัญหาในขั้นการชักนำให้เกิดต้นใหม่แม้จะใช้ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่สูงกว่าในการทดลองนี้มาก ตัวอย่างเช่น ในหญ้า buffel บางสายพันธุ์ที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีเมื่อมีการใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 3.00-9.00 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วงการชักนำให้เกิดแคลลัสและแคลลัสดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เป็นจำนวนมาก (Columba *et al.* 2006) อาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์พืช และชิ้นส่วนที่ใช้มีผลต่อการตอบสนองที่ได้แตกต่างกัน และถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็อาจส่งผลต่อการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วย (มาลี ณ นคร. 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ผลการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม 2 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pCAMBIA1301 พบว่า อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 มีความเหมาะสมต่อการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีมากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Yang *et al.* (2008) ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกหอมเมื่อใช้เวคเตอร์ pCAMBIA1301 เมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค gus assay และ PCR เช่นเดียวกับการทดลองในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เวคเตอร์ชนิดนี้ เช่น หญ้า tall fescue (Zeng and Yaxin. 2005) หญ้า buffel (Shweta and Suresh. 2003) หญ้า Darnel rye (Yaxin *et al.* 2007) หญ้า Bermuda (Li *et al.* 2005) และ หญ้า perennial rye (Wu *et al.* 2005) ในขณะที่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรีไม่ประสบความสำเร็จในการทดลองครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเวคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองไม่เหมาะสม อีกทั้งประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่ค่อนข้างต่ำ จึงส่งผลต่อการถ่ายโอนดีเอ็นเอ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวค่อนข้างยากที่จะประสบผลสำเร็จเมื่อเทียบกับการทดลองในพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากเป็นผลมาจากปัจจัยหลาย ๆ อย่างร่วมกัน อาทิเช่น สายพันธุ์พืช ชนิดของชิ้นส่วนพืช สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียม ชนิดของเวคเตอร์ สูตรอาหาร ตลอดจนวิธีการที่ใช้ในการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (Nandakumar *et al.* 2004 ; Cheng *et al.* 2004) ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด ต้องทำการ pre-culture ชิ้นส่วนก่อนนำมาทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนดีเอ็นเอให้ประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น (Daniel *et al.* 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 ผลการศึกษาการชักนำตาข้างของหญ้าแฝกให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6.1.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของหญ้าแฝก 2 สายพันธุ์

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรี พบว่าสูตรอาหารและสายพันธุ์มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันโดยในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างได้ดีที่สุด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด 82.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในสายพันธุ์ราชบุรี อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด 61.25 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

6.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นใหม่ในสภาพมีแสง แคลลัสหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีในวิธีการที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าสายพันธุ์ราชบุรี โดยสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงสุด 80.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในสายพันธุ์ราชบุรี แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่สูงสุด 15.00 เปอร์เซ็นต์ซึ่งถือว่าต่ำมากเมื่อเทียบกับในสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี ทั้งนี้ความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมนที่ใช้อาจไม่เหมาะสม การศึกษาต่อไปจึงควรทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมน หรือเติมสารส่งเสริมที่มีผลในการช่วยเพิ่มอัตราการพัฒนาเป็นต้นใหม่

เมื่อทำการตรวจสอบจำนวนยอดต่อแคลลัสและความยาวยอด พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 9.59 ยอดต่อแคลลัส มีความยาวยอดเฉลี่ย 0.64 เซนติเมตร ในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี ในขณะที่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อแคลลัสสูงสุด 2.5 ยอดต่อแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย 0.65 เซนติเมตร

6.2 ผลการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

6.2.1 ผลของหญ้าแฝกที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอเมื่อทำการคัดเลือกบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ

จากผลการทดลองการถ่ายโอนยีนในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี พบว่า เมื่อใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 พบต้นที่รอดชีวิตคิดเป็น 9.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการคัดเลือกในอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ต้นที่ได้จากการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 มีต้นที่รอดชีวิตคิดเป็น 6.28 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการคัดเลือกในอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนต้นที่ได้จากการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 ไม่พบต้นที่รอดชีวิตภายหลังการคัดเลือกบนอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาในระยะแรกแคลลัสบางส่วนเกิดจุดเขียว และตายในที่สุดภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 หรือ pCAMBIA1301 และเมื่อใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 แคลลัสจะมีสีม่วง และตายในที่สุด

6.2.2 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Gus assay

จากการตรวจสอบการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค gus assay พบว่ามีการติดสีน้ำเงินจาง ๆ บริเวณชิ้นส่วนใบในส่วนของท่อลำเลียงเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ สุราษฎร์ธานีที่ผ่านการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้อะโกรแบคที่เรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีน gus มีการแสดงออกได้ไม่ดีพอจึงส่งผลต่อการย่อยสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลองทำให้มองเห็นการติดสีในบริเวณใบค่อนข้างต่ำ หรือเอนไซม์ที่ผลิตได้สัมผัสกับสารตั้งต้นได้น้อยเนื่องจากใบของหญ้าแฝกสายพันธุ์นี้มีผิวเคลือบ จึงมองเห็นสีน้ำเงินจาง ๆ

6.2.3 ผลการตรวจสอบหญ้าแฝกที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction : PCR

จากการทดลองตรวจสอบการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่จีโนมิกดีเอ็นเอของหญ้าแฝกโดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ในสภาวะที่ทำการทดลองอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1301 มีความเหมาะสมในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานีมากที่สุด ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนดีเอ็นเอ 5.45 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์ราชบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องทำการศึกษาถึงวิธีการ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายโอนดีเอ็นเอโดยใช้สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียม และพลาสมิดในการทดลองครั้งนี้ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่หญ้าแฝกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กนกพร สมพรไพลิน. 2005. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช**. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กรมป่าไม้. 2543. **การผลิตฉนวนความร้อนจากเส้นใยหญ้าแฝก**. กรุงเทพฯ : กลุ่มงานพัฒนาอุตสาหกรรมไม้และป้องกันรักษาเนื้อไม้ สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2541. **หญ้าแฝก**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2546. **คู่มือการปฏิบัติงานการขยายพันธุ์และการปลูกหญ้าแฝก**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2549. **ความรู้เรื่องหญ้าแฝก**. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

คำนูญ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. พิมพ์ครั้งที่1 กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไลบูลย์, ปราณี ลี้ชนะชัย, ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี, สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, วีรพงศ์ ลุลิตานนท์ และวิเศษ นามวาท. 2540. **PCR Technology and Application**. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

น้องนุช พจน์ชัยกุล, รงรอง วิเศษสุวรรณ และมณฑา วงศ์มณีโรจน์. 2542. "การสร้างแคลลัสและต้นอ่อนของหญ้าแพรกหิน." หน้า 496-497. ใน **หนังสือรวมบทคัดย่อผลงานวิจัยของคณาจารย์ในสถานศึกษาไทยในระหว่างปี 2540-2542**. กรุงเทพฯ : สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย.

นิตย์ศรี แสงเดือน และสัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2548. **เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรนาม. 2550. ลักษณะของหญ้าแฝก. [Online]. Available : http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/WEB_ORI/web_veti/research/veti_introl.html. 18 ตุลาคม 2550

นิรนาม. 2553. Transformation technology. [Online]. Available : http://www.umanitoba.ca/faculties/afs/plant_science/courses/39_768/l02/l02.3.html 19 พฤษภาคม 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรีชา ประเทพา. 2543. **เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม.** ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มโนชย์ จงรักวิทย์. 2539. "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มาลี ณ นคร. 2544. **ระเบียบวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชดา ไชยเจริญ, มาลี ณ. นคร, ศรีสม สุรวัฒนานนท์, เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ, ลิลลี่ กาวีต๊ะ และสุรียา ตันติวิวัฒน์. 2543. "การชักนำให้เกิดแคลลัสและความสามารถในการทนเค็มของแคลลัสหญ้าปากควายในสภาพหลอดทดลอง" หน้า 421-427. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38.** กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนา ขามฤทธิ์, สุมนทิพย์ บุนนาค และประสิทธิ์ ใจศิล. 2549. "การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีน chitinase สู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) พันธุ์ Phil 66-07 โดย *Agrobacterium tumefaciens*" หน้า 17-18. ใน **สัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2549.** ขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เล็ก มอญเจริญ, วิฑูรย์ ชินพันธุ์ และอาทิตย์ ศุขเกษม. 2538. "เทคนิคการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์หญ้าแฝกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." หน้า 258. ใน **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535-2536.** กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กองแผนงาน.

วารุณี พานิชผล, ชิต ยุทธวรวิทย์ และสมพล ไวปัญญา. 2538. **"คุณค่าทางโภชนะของหญ้าแฝกหมักที่เติมสารชนิดต่าง ๆ."** กรุงเทพฯ : กรมปศุสัตว์.

วีระชัย ณ. นคร. 2536. "การศึกษาอนุกรมวิธานของหญ้าสกุล Vetiveria ในประเทศไทย." ใน **รายงานการดำเนินงานโครงการใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริประจำปี 2536.** กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กองแผนงาน.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่2 กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรสรรค์.

Arockiasamy, S. and Ignacimuthu, S. 2007. "Regeneration of transgenic plants from two indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using shoot apex explants." **Plant Cell Report** 26 : 1745-1753.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chen, Y., Shen, Z. and Li, X. 2004. "The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals." **Application Geochemistry** 19 : 1553-1565.

Cheng, M., Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, X. D. and Amstrong C. L. 2004. Invited Review : Factors influencing *Agrobacterium*-Mediated transformation of monocotyledonous species." **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 40 : 31-45.

Colomba, E. L., Grunberg, K., Griffa, S., Ribootta, A., Mroginskit, L. and Biderbost, E. 2006. "The effect of genotype and culture medium on somatic embrygenesis and plant regeneration from mature embryos of fourteen apomictic cultivars of buffel grass (*Cenchrus ciliaris L.*)." 2006. **Grass and Forage Science** 61 : 2-8.

Colleen, A. M. and Andrew, N. 2006. "*Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer." **The Annual Review of Cell and Developmental Biology** 22 : 101-127.

Daniel, I. P., Hans, T. C., Klaus, K. N. and Ingo, L. 2008. "A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass midel species *Brachypodium distachyon L.*" **Transgenic Research** 17 : 965-975.

Ge, Y., Xiaofei, C., Andrew, H. and Zeng, Y.W. 2007. "Generation of transgenic *Lolium temulentum* plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation." **Plant Cell Report** 26 : 783-789.

Han, N., Dong, C., Hong, W.B., Min, J.D. and Mu, Y.Z. 2005. "Production of transgenic creeping bentgrass *Agrostis stolonifera* var. *palustris* plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using hygromycin selection." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 81 : 131-138.

Hue, X.W., Wei, J.H., Xu, C.B., Mi, F.G. and Yun, J.F. 2006. "Plant regeneration from immature inflorescence culture and genetic transformation of wheatgrass (*Agropyron cristatum x A. desertorum cv.* Hycrest-Mengnong)" **Journal Agricultural Science** 5 : 648-654.

Jain, M. Kudithipudi, C. Maria, G. M. and Paul, M. 2005. "Embryogenic callus induction and reageneration in a pentaploid hybrid bermudagrass cv. Tifton85." **Crop Science** 45 : 1069-1072.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Leyser, O. 1998. "Axin, cell division and the control of plant development." 59-65. in John, A. B. and Doato, C. (eds.) **Plant Cell Proliferation and Its Regulation in Growth and Development.** England : John Willey & Sons.

Lee, K. W., Gi, J. C., Ki-Yong, K., Hee, C. J., Hyung, S. P., Sei, H. Y. and Song-Hoon, L. 2009. "High frequency plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars." **African Journal of Biotechnology** 8 : 6828-6833.

Lee, S.H., Lee, D.G., Woo, H.S., Lee, K.W., Kim, D.H., Kwak, S.S., Kim, J.S., Kim, H., Ahsan, N., Choi, M.S., Yang, J.K. and Lee, B.H. 2006. "Production of transgenic orchardgrass via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissue." **Plant Science** 171 : 408-414.

Li, L., Li, R., Fei, S. and Qu, R. 2005 "*Agrobacterium*-mediated transformation of common bermudagrass (*Cynodon dactylon*)." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 83 : 223–229.

Lui, G. S., Lui, J. S., Qi, D. M., Chu, C. C. and Li, H. J. 2004. "Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*)." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 76 : 175-178.

Macro, M., Gallino, M., Scannerini, S. and Maffei, M. 1993. "Callus induction and plant regeneration in *Vetiveria zizanioides*." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 35 : 267-271.

Milka, I. and Thomas, L. R. 1998. "Cytokinins and plant cell cycle : problem and pitfall of proving their function." 45-58. in John, A. B. and Doato, C. (eds.) **Plant Cell Proliferation and Its Regulation in Growth and Development.** England : John Willey & Sons.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture." **Physiologia Plantarum** 15 : 473-497.

Nandakumar, R., Chen, L. and Rogers SMD. 2004. "Factors affecting the Agrobacterium-mediated transient transformation of wetland monocot, *Typha latifolia*." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 79 : 31-38.

Owino, J.O., Owido, S.F.O. and Chemelil, M.C. 2005. "Nutrients in runoff from a clay loam soil protected by narrow grass stripe." **Soil & Tillage Research** 88 : 116-122.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prasertsongskun, S. 2003. "Plant regeneration from callus culture of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* Nash.)" **Songklanakarin Journal Science Technolog.** 25 : 637-642.

Prasertsongskun, S. 2004. "Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver" **Songklanakarin Journal Science Technology** 26 : 411-416.

Roberta, H. M. 2000. **Plant Tissue Culture Techniques and Experiments.** 2nd ed. United States of America : Academic press.

Ruth, E. L., Leupin, M., Ehert, C., Erisman, K. H. and Witholt, B. 2000. "Compact callus induction and plant regeneration of non-flowering vetiver from Java." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 62 : 115-123.

Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. **Molecular Cloning a Laboratory Manual.** 3rd ed. United States of America : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sangduen, N. and Prasertsongskun, S. 2009. "Regenration and application : suspension cultured-derived inflorescences of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash to selection of herbicide-resistant cell." **Assumption University Journal of Technology** 12 : 135-148.

Satyavathi, V. V., Jauhar, P. P., Elias, E. M. and Rao, M. B. 2004. "Effects of growth regulators on in vitro plant regeneration in durum weat." **Crop Science** 44 : 1839-1846.

Shweta, B. and Suresh, K. 2003. "*Agrobacterium*-mediated transient *Gus* gene expression in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.)." **Journal of Applied Genetics** 44 : 449-458.

Suratman, F., Huyop, F., Wagiran, A., Rahmat, Z., Ghazali H. and Parveez G.K.A. 2010. "Cotyledon with Hypocotyl Segment as an Explant for the Production of Transgenic*Citrullus vulgaris* Schrad (Watermelon) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*." **Biotechnology** 9 : 106-118.

Toriyama, K. and Hinata, K. 1985. "Cell suspension and protoplast culture in rice." **Plant Science** 41 : 179-183.

Ward, M. and Jordan, M. 2001. "Callus formation and plant regeneration from immature and mature embryos of rye (*Secale cereale* L.)." **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 37 : 361-368.

Wu, Y. Y., Chen, Q. J., Chen, M., Chen, J. and Wang, X. C. 2005. "Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar Na+/H+ antiporter gene." **Plant science** 169 : 65-73.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yajun, X., Chunxiang, F., Yaxin, G., Rangaraj, N., Hiroshi, H., Joseph, B. and Zeng, Y. W. 2009. "*Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass and inheritance of the transgenes." **Bioenergy Research** 2 : 275-283.

Yang, B., Wu, G., Ma, Z. and Xia, H. 2008. "Study on efficient regeneration system and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vetiveria zizanioides*." **Pakistan Journal of Botany** 40 :911-921

Yaxin, G., Xiaofei, C., Andrew, H. and Zeng, Y. W. 2007. "Generation of transgenic Lolium temulentum plants by *Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation." **Plants Cell Report** 26 : 783-789.

Yu, T.T., Skinner, D.Z., Liang G.H., Trick, H.N., Huang, B. and Muthukrishnan, S. 2000. "*Agrobacterium*-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene." **Hereditas** 133 : 229-233.

Zeng, Y. W. and Yaxin, G. 2005. "*Agrobacterium*-mediated high efficiency transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea*)." **Journal of Plant Physiology** 162 : 103-113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรีที่เจริญบนอาหารแข็ง MS สูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	Pr>F
Treatment	3	41042.96875	13680.98958	39.75	<0.0001**
Culture	1	316.40625	316.40625	0.92	0.3441ns
Medium	1	2441.40625	2441.40625	7.09	0.0115*
CulturexMedium	1	38285.15625	38285.15625	111.23	<0.0001**
Error	36	12390.625	344.18403		
Total	39	53433.59375			

CV = 45.32%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นใหม่ในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรีที่เจริญบนอาหารแข็ง MS สูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	Pr>F
Treatment	9	73197.5625	8133.0625	13.72	<0.0001**
Culture	1	70623.06250	70623.06250	119.16	<0.0001**
Medium	4	752.25000	188.06250	0.32	0.8657ns
CulturexMedium	4	1822.25000	455.56250	0.77	0.5484ns
Error	90	53340.6250	592.6736		
Total	99	126538.1875			

CV = 61.52%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ผลจำนวนยอดต่อแคลลัสในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรีที่เจริญบนอาหารแข็ง MS สูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	Pr>F
Treatment	9	1153.861716	128.206857	13.88	<0.0001**
Culture	1	1106.094564	1106.094564	119.73	<0.0001**
Medium	4	23.135976	5.783994	0.63	0.6451ns
CulturexMedium	4	24.631176	6.157794	0.67	0.6168ns
Error	90	831.414320	9.237937		
Total	99	1985.276036			

CV = 61.52%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความยาวยอดในหญ้าแฝกสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี และราชบุรี ที่เจริญบนอาหารแข็ง MS สูตรต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

Source	df	SS	MS	F-test	Pr>F
Treatment	9	4.20084100	0.46676011	8.93	<0.0001**
Culture	1	3.94816900	3.94816900	75.55	<0.0001**
Medium	4	0.15137600	0.03784400	0.72	0.5777ns
CulturexMedium	4	0.10129600	0.02532400	0.48	0.7470ns
Error	90	4.70349000	0.05226100		
Total	99	8.90433100			

CV = 54.60%

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962)

Macroelements	
NH_4NO_3	1650.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
KNO_3	1900.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	440.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	370.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	170.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Microelement	
$Na_2.EDTA$	37.30 มิลลิกรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	27.80 มิลลิกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	6.20 มิลลิกรัมต่อลิตร
$MnSO_4.4H_2O$	22.30 มิลลิกรัมต่อลิตร
$ZnSO_4.H_2O$	8.60 มิลลิกรัมต่อลิตร
KI	0.90 มิลลิกรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
$CoCl_2.6H_2O$	0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Organic compound	
Myo-inositol	100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Glycine	2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Nicotinic acid	0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
Pyridoxine-HCl	0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
Thymine-HCl	0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร
Sucrose	30000.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Agar	8000.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
pH	5.6-5.8

หมายเหตุ กรณีเป็นอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสใช้น้ำตาลซูโครส 20000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

4.1 2,4-D

ชั่งสารน้ำหนักตามความเข้มข้นที่ต้องการเตรียมเป็น stock ละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4.2 .NAA

ชั่งสารน้ำหนักตามความเข้มข้นที่ต้องการเตรียมเป็น stock ละลายใน 1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4.3 BA

ชั่งสารน้ำหนักตามความเข้มข้นที่ต้องการเตรียมเป็น stock ละลายใน 1N ไฮโดรคลอริก จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ใช้ความร้อนช่วยในการละลายให้ง่ายขึ้น)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)

Bacto-tryptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Yeast-extract	5.0	กรัมต่อลิตร
NaCl	5.0	กรัมต่อลิตร
pH	7.2-7.4	

หมายเหตุ อาหารแข็งใช้ผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร AAM (Toriyama and Hinata. 1985)

AAM macroelements		
$Na_2HPO_4.2H_2O$	169.60	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	500.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
KCl	150.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	150.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
AAM Microelement		
$MnSO_4.4H_2O$	10.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	มิลลิกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	3.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
$ZnSO_4.H_2O$	2.00	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.0387	มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CoCl_2.6H_2O$	0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร
KI	0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร
AAM iron	
$FeSO_4.7H_2O$	28.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
MS vitamin	
Inosital	100.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Nicotinic acid	0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
Pyridoxine-HCl	0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
Thymine-HCl	0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
AAM amino acid	
Glycine	7.50 มิลลิกรัมต่อลิตร
Arginine	174.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Glutamine	876.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Casamino acid	500.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
Sucrose	68.50 กรัมต่อลิตร
Glucrose	35.00 กรัมต่อลิตร
pH	5.2

5. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืช

5.1 สารละลายสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 2 เท่า

0.6 M	NaCl
0.1 M	Tris-HCl (pH 7.5)
40 mM	EDTA (pH 8.0)
1%	SDS

5.2 สารสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 เท่า

สารละลายสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 2 เท่า

5 M	Urea
10 mM	mercaptoethanal
5% (V/V)	Phenal

ปรับปริมาตรเป็น 2 เท่า

5.3 สารละลายผสม Phenal/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 RNase A (20 μg/ml)

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำอิเล็คโตรโฟริซิส

6.1 เจลอะกาโรส	10	กรัมต่อลิตร

6.2 สารละลาย TBE ความเข้มข้น 5 เท่า ประกอบด้วย

Tris	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA	20	มิลลิลิตร

6.3 บัฟเฟอร์สำหรับหยอดดีเอ็นเอความเข้มข้น 6 เท่า ประกอบด้วย

Bromophenol Blue	25	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	25	มิลลิกรัม
Ficoll 400	2.5	กรัม

ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

7. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Gus*

7.1 Buffer solution stocks

Solution A (ปริมาตร100 มิลลิลิตร)

$NaPO_4$ 0.2โมลาร์		
$Na_2HPO_4.7H_2O$	2.09	กรัม
NaH_2P	1.48	กรัม
$Na_2EDTA.2H_2O$	1.86	กรัม

Solution B (0.1M) ใน 10 ml

$K_3Fe(CN)_6$	0.320	กรัม

Solution C (0.1 M) ใน 10 ml

$K_4Fe(CN)_6.3H_2O$	0.422	กรัม

Solution D (0.1%) ใน 10 ml

Triton X-100	10	ไมโครลิตร

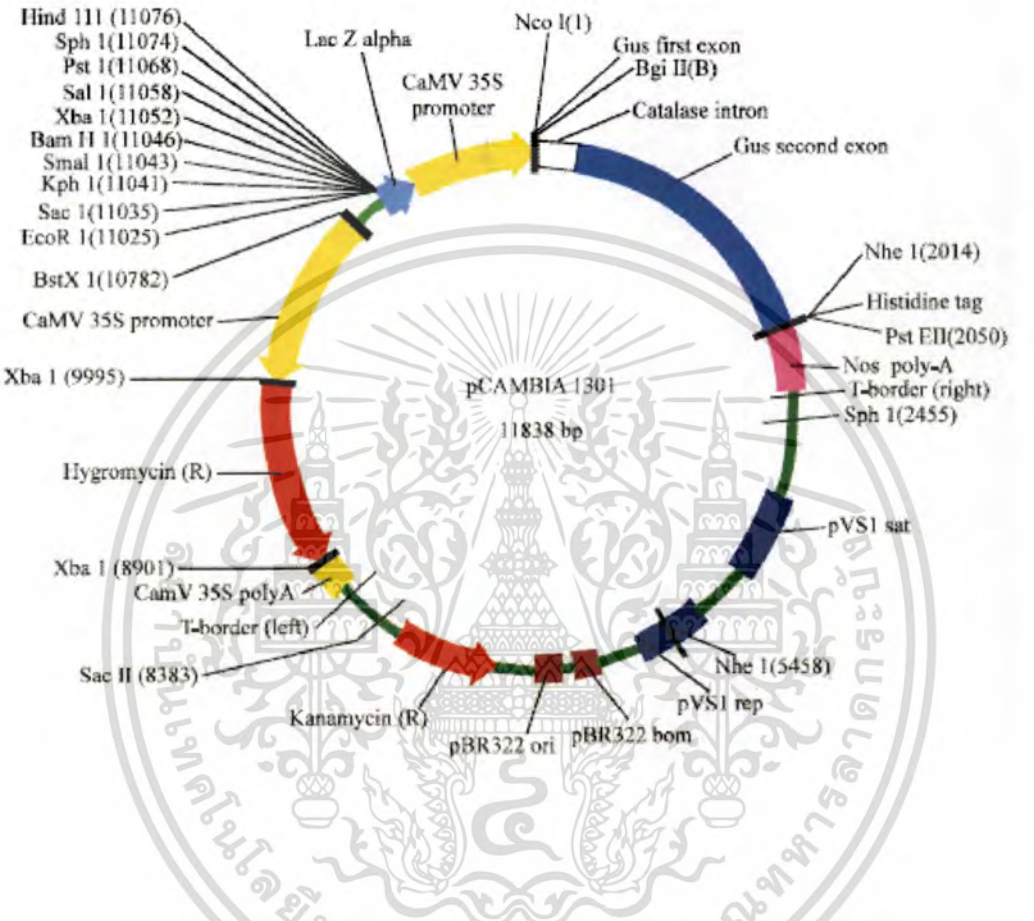
7.2 X-Gluc (5-bromo-4chloro-3-indolyl-B-D-Glucuronide)

X-Gluc	5-10	มิลลิกรัม
ละลายใน DMSO	0.25	มิลลิลิตร

(dimethyl sulfoxide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

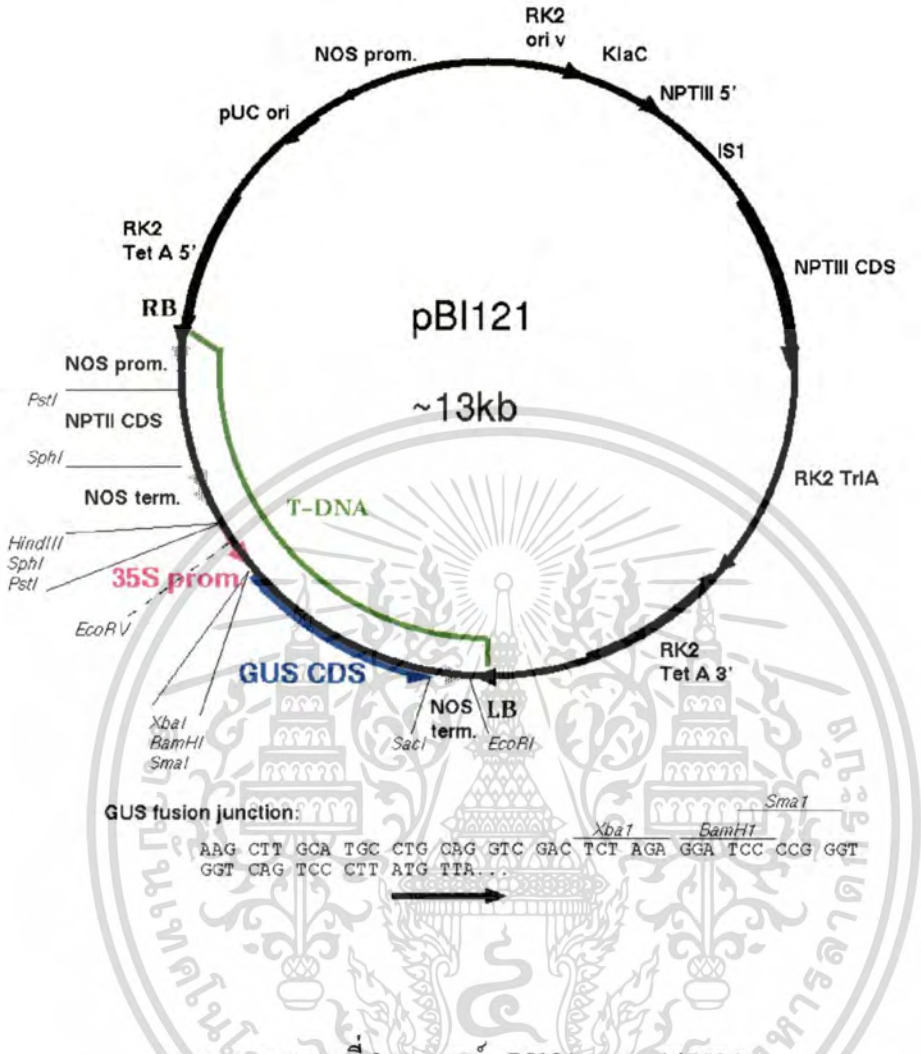
เวคเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพภาคผนวกที่ 1 เวคเตอร์ pCAMBIA1301 ขนาด 11838 คู่เบส

ที่มา : Suratman *et al.* 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 2 เวคเตอร์ pBI121 ขนาด 14758 bp

ที่มา : http://www.umanitoba.ca/faculties/afs/plant_science/courses/39_768/l02/l02.3.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ชนนิกานต์ ขวัญช่วย
วัน เดือน ปีเกิด	27 เมษายน 2527 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ที่อยู่	297/1 หมู่ 1 ต. เวียงสระ อ. เวียงสระ จ. สุราษฎร์ธานี 84190
โทร	0810789927
E-mail:	chonnikarn27@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

2549 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี เรื่องผลของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อการเจริญของเชื้อราโรคพืชบางชนิด (The effect of aqueous extract of *Stemona curtisii* Hook. f. on growth of some pathogenic fungi)

ผลงานวิจัย

24-25 ตุลาคม 2552 ตีพิมพ์งานวิจัย "Callus Induction and Plant Regeneration from *Vetiveria zizanioides* (L.) NESH" ใน The 21st Annual Meeting and International Conferrence of Thai Society for Biotechnology ณ. ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้