

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การถ่ายยีน ANTISENSE ของ DIHYDROFLAVONAL 4-REDUCTASE
(DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุนทรริก โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

TRANSFORMATION OF DIHYDROFLAVONAL 4-REDUCTASE (DFR)
ANTISENSE INTO SACRED LOTUS 'BUNTARIK' USING *AGROBACTERIUM*
MEDIATED GENE TRANSFER



T117043

วิลาลินี ลีทวีทรัพย์

WILASINEE LEETHAWEE SUP

ฉพ.

๑๗๒๒๗

๒๕๕๔

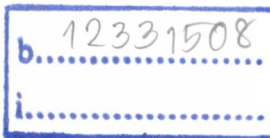
เลขพญ.....

117043

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี.....

21 ส.ย. 2554



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2554

KMITL-2011-AG-M-101-078

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**TRANSFORMATION OF DIHYDROFLAVONAL 4-REDUCTASE (*DFR*)
ANTISENSE INTO SACRED LOTUS 'BUNTARIK' USING *AGROBACTERIUM*
MEDIATED GENE TRANSFER**



**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**

2011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องสมุดของสถาบันฯ เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การถ่ายยีน Antisense ของ Dihydroflavonol 4-
Reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

นักศึกษา

นางสาววิลาสินี ลิทธิทรัพย์

รหัสประจำตัว

49068904

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

พ.ศ.

2554

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รศ.ดร.สุเม อรฉัตร

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และแสง ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายใต้ปัจจัยสีของแสง ระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด คือ 3.80 คะแนน โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ฉ่ำน้ำ และชิ้นส่วนจะมีลักษณะที่คล้ายกับต้น สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ ภายใต้แสงสีแดง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ชิ้นส่วนทั้งสองไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะไปเป็นต้น สำหรับขนาดของชิ้นส่วนนั้น ชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ และขนาดชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งสองจะเพิ่มขึ้นในทุกๆ สัปดาห์ในปัจจัยแสงทั้งสองที่ทำการทดลอง

จากการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้น 0 50 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะตายทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณยทริก ที่เป็น binary vector ซึ่งบรรจุพลาสมิด 2 ชนิด คือ pCAMBIA2301DFR ซึ่งมียีน *neomycin phosphotransferase (NPTII)* เป็นยีนเครื่องหมาย ยีน antisense *DFR* เป็นยีนที่ต้องการใส่เข้าไปในต้นพืช และยีน β -glucuronidas (*GUS*) เป็นยีนรายงานผล สำหรับพลาสมิดชนิดที่ 2 คือ pBI121DFR ซึ่งมียีน *NPTII* และยีน antisense *DFR* โดยบ่มเชื้อร่วมกับแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาดอกจากคัพพะ เป็นเวลา 2 เดือน ในสภาพปลอดเชื้อ ที่ความเข้มข้นเชื้อและระยะเวลาที่ 1:10 แชนนาน 10 นาที และ 1:10 แชนนาน 30 นาที เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมอะซิโตไซลิ่งโคน เป็นเวลา 2 วันในสภาพมืด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6-0.7 แล้วจึงกำจัดเชื้อโดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโอฟแทกซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือก โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่มีพลาสมิดทั้งสองชนิด มีการเจริญเติบโตของแคลลัส ขนาดของแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสดีที่สุดที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อร่วมกับระยะเวลาการบ่มที่ 1:10 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำต้นที่ผ่านการคัดเลือกมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี Gus histochemical assay โดยใช้ส่วนของก้านใบ และใบ พบว่า การถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR ก้านใบและใบที่นำมาทดสอบ ติดสีน้ำเงินดีที่สุดที่สุด คือ 51.19 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการบ่มเชื้อ 1:10 แชนนาน 30 นาที สำหรับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR ก้านใบ และใบที่นำมาทดสอบ ติดสีน้ำเงินเท่ากับที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกวิธีการ จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยพบต้นที่มียีน *GUS* จำนวน 5 โคลน ต้นที่มียีน *NPTII* จำนวน 11 โคลน และต้นที่มียีน *DFR* จำนวน 6 โคลน

Thesis Title	Transformation of Dihydroflavonal 4-Reductase (<i>DFR</i>) Antisense into Sacred Lotus 'Buntarik' using <i>Agrobacterium</i> Mediated Gene Transfer.
Student	Miss. Wilasinee Leethaweewsup
Student ID.	49068904
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2011
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Kanjana Saetiew
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Sumay Arunyanart

ABSTRACT

Effect of explant types and light on callus growth of sacred lotus 'Buntarik' (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) were studied under photoperiods cool white fluorescent and red light for 16 hours per day. The apical buds and petioles from embryo were used as explants. They were cultured on Murashige and Skoog (1962) medium containing a combination of 40 μM NAA (α -Naphthaleneacetic acid) and 0.5 μM TDZ (Thidiazuron) for 16 weeks. It was found that all explants produced callus. The best callus induction was produced from apical buds and petiole explants. The callus was green and friable. The highest score of callus growth (3.80) was achieved from all explants. Shoots from apical buds were regenerated under white light whereas apical buds and petioles produced callus under red light and didn't regenerate shoots. The callus from petioles had bigger size than callus from apical bud explants.

The kanamycin concentration was tested for suitable growth of lotus for transgenic plant selection. The apical buds from embryo cultured on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with 0 50 100 200 and 300 mg/l kanamycin for 8 weeks. The explants were transferred to the same medium every 2 weeks. Kanamycin at 50 mg/l was the lowest concentration that could eliminate all explants.

Transformation of dihydroflavonal 4-reductase (*DFR*) antisense into sacred lotus 'Buntarik' using *Agrobacterium* mediated gene transfer. The *A. tumefaciens* strain EHA105 harbored the binary vector. There were pCAMBIA2301DFR plasmid contained *neomycin phosphotransferase (NPTII)* as a selectable maker gene and the dihydroflavonal 4-reductase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*DFR*) antisense was a inserted gene and the β -glucuronidas gene (*GUS*) was a reportor gene. The pBI121DFR plasmid contained *neomycin phosphotransferase* gene (*NPTII*) and the dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) antisense. The apical buds form calli (2 months old) used as explants. The bacteria was diluted to 1:10 and soaked for 10 minutes and 1:10 soaked for 30 minutes. The suspension at OD₆₀₀ in the range of 0.6-0.7 were diluted with MS. The apical buds were co-cultivated for 2 days in the dark. Treated apical buds were selected in MS medium containing 50 mg/l kanamycin and 250 mg/l cefotaxime for 8 weeks. The calli were transferred to the same medium every 2 weeks. Transformed callus from embyo which cultured on MS medium containing a combination of 0.54 μ M NAA (α -Naphthaleneacetic acid) and 4.44 μ M BA (6-Benzylaminopurine) were regenerated shoots after 16 weeks. The both plasmids gave the best callus growth, maximum callus size and the percentage of survival callus when the concentration of 1:10 and soaked for 10 minutes. GUS bioassay was used to observe *GUS* gene expression in petioles and leaves of transgenic plants. It was found that when petioles and leaves were transformed with pCAMBIA2301DFR soaked for 30 minutes, the maximum percentages of blue spots (51.19%) on explants were obtained. The petioles and leaves transformed with pBI121DFR soaked for 10 and 30 minutes provided no different percentage of blue spot. Of all 14 clones shows PCR positive which showed *GUS* gene 5 clones and *NPTII* gene 11 clones and *DFR* gene 6 clones.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เป็นอย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.สุเม อรัญนารถ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ช่วยแก้ปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกทราบบ้างในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุเม อรัญนารถ ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว ผศ.ดร.งามนิจ ชื่นบุญงาม ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ และ ดร.อรอุมา รุ่งน้อย กรรมการสอบหัวข้อโครงร่างวิทยานิพนธ์ และวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และคณาจารย์ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่างๆ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับคุณพ่อวิชัย และคุณแม่วรา ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา ประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่าน ตลอดจนผู้ที่สามารถนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ได้ต่อไป

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรมและทุนสนับสนุนทำเล่มวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตศึกษาวิทยาลัย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

วิลาสินี ลิทวิทรัพย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XI
รายการคำย่อ.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์.....	2
1.3 สมมุติฐาน.....	2
1.4 ทฤษฎีและแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	2
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.6 ขั้นตอนการศึกษา.....	3
1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความรู้เกี่ยวกับบัวหลวง และการเพาะเลี้ยงแคลลัส.....	4
2.1.1 บัวหลวง.....	4
2.1.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	5
2.1.2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส.....	5
2.1.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวง.....	7
2.2 การถ่ายยีนเข้าสู่พืช.....	8
2.2.1 เทคนิคการถ่ายยีน.....	8
2.2.1.1 การส่งถ่ายยีนโดยตรง.....	8
2.2.1.2 การส่งถ่ายยีนโดยใช้พาหะ.....	10
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีน โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ.....	12
2.3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย.....	12
2.3.2 พันธุกรรมและสรีรวิทยาของชิ้นส่วนพืช.....	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรในหน่วยงานนั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.3	วิธีการทำบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมาย.....	12
2.3.3.1	การทำบาดแผลโดยใช้มีดกรีด.....	12
2.3.3.2	การทำบาดแผลโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียง.....	12
2.3.3.3	การทำบาดแผลโดย silicon carbide.....	13
2.3.3.4	การทำบาดแผลโดยใช้สุญญากาศ.....	13
2.3.4	อะซีโตไซลิง โคน.....	13
2.3.5	สภาพการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย.....	14
2.3.5.1	สภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์พืช.....	14
2.3.5.2	สภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย.....	14
2.3.6	ผลของ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังจากถ่ายยีน.....	14
2.3.7	ยื่นเครื่องหมาย และยื่นรายงานผลที่ใช้ในพืช.....	15
2.3.7.1	ยื่นเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก.....	15
2.3.7.2	ยื่นรายงานผล.....	16
2.4	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย.....	17
2.5	การถ่ายฝากยีนควบคุมสีดอกด้วย dihydroflavonol 4-reductase.....	21
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย.....	25
3.1	เครื่องมือและวิธีการ.....	25
3.1.1	พืชทดสอบ.....	25
3.1.2	เชื้อทดลอง.....	25
3.1.3	พลาสติกทดลอง.....	25
3.1.4	สารเคมี.....	25
3.1.4.1	สารเคมีเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร MS	25
3.1.4.2	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช.....	25
3.1.4.3	สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ.....	25
3.1.4.4	สารเคมีเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ สูตร YM.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.4.5 สารเคมีเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ สูตร LB.....	26
3.1.4.6 สารปฏิชีวนะ.....	26
3.1.4.7 สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากบัวหลวง.....	26
3.1.4.8 สารเคมีสำหรับการทำพีซีอาร์.....	27
3.1.4.9 สารเคมีสำหรับเตรียมเจล.....	27
3.1.4.10 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ GUS.....	27
3.1.5 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ.....	27
3.2 สถานที่ดำเนินงาน.....	28
3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง.....	28
3.4 วิธีการดำเนินงาน.....	28
3.4.1 การเตรียมพืชทดลอง.....	28
3.4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.4.2.1 การเตรียมอาหารสูตรชั่งน้ำหนัก.....	29
3.4.2.2 การเตรียมอาหารสูตรชั่งน้ำหนักให้เกิดขึ้น.....	29
3.4.3 การสร้างพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR.....	34
3.4.3.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ <i>E.coli</i> DH5 α	34
3.4.3.2 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI121DFR.....	34
3.4.3.3 การตรวจสอบพลาสมิด.....	36
3.4.3.4 การสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR.....	37
3.4.4 การนำพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย.....	38
3.4.4.1 การเตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย.....	38
3.4.4.2 การนำพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR เข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย.....	39
3.4.5 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชทดลอง.....	39
3.4.6 การตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่พืช.....	40
3.5 การบันทึกผล.....	43
3.5.1 บันทึกผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.5.2 บันทึกผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS*..... 43
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>GUS</i> และยีน <i>DFR</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์.....	43
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
4.1 ผลการทดลองที่ 1.....	44
ผลการทดลองที่ 2.....	47
4.2 ผลของการสร้างพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIE2301DFR.....	51
4.2.1 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI121DFR.....	51
4.2.2 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pBI121DFR.....	51
4.2.3 การสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR.....	51
4.2.4 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA2301DFR.....	52
ผลการทดลองที่ 3.....	57
บทที่ 5 วิจัยผลผลการทดลอง.....	73
5.1 ชิ้นส่วนเริ่มต้น และแสง ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	73
5.2 การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน.....	74
5.3 การถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (<i>DFR</i>) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105.....	75
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	79
บรรณานุกรม.....	81
ภาคผนวก ก ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962) และการเตรียมสารเคมี.....	92
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	95
ประวัติผู้เขียน.....	118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช.....	16
3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์.....	42
4.1 คะแนนการเจริญเติบโตแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพพะ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light).....	45
4.2 ขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากคัพพะ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light).....	46
4.3 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสาร ปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ.....	48
4.4 ผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้นต่างๆต่อขนาดของชิ้นส่วนตายอดจาก คัพพะ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS.....	49
4.5 ขนาดของแคลลัสหลังการถ่ายยีน บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์.....	60
4.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส หลังจากการถ่ายยีน บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์.....	61
4.7 การให้คะแนนการติดสีน้ำเงินจากการทดสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay.....	62
4.8 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GUS</i> ด้วยวิธี Gus histochemical assay.....	67
4.9 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GUS</i> ยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>DFR</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	68
4.10 สรุปผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GUS</i> ยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>DFR</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 บั้วหลวงพันธุ่มุณทริก	5
2.2 การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่โนมพืช.....	11
2.3 สูตร โครงสร้างทางเคมีของ acetocyringone.....	14
2.4 กระบวนการสังเคราะห์ Flavonoids.....	22
3.1 แสดงลักษณะเมล็ดบั้วหลวงพันธุ่มุณทริก และคัพพะ.....	29
3.2 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตแคลล์สของบั้วหลวงพันธุ่มุณทริก.....	31
3.3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตขึ้นส่วนตายออกจากคัพพะของบั้วหลวงพันธุ่มุณทริก.....	33
3.4 พลาสมิด pTZDFR.....	36
3.5 พลาสมิด pBI121.....	36
3.6 พลาสมิด pCAMBIA2301.....	38
3.7 ขั้นตอนการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ จำนวน 34 รอบ.....	42
3.8 ขั้นตอนการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ จำนวน 30 รอบ.....	42
4.1 แสดงการทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อขึ้นส่วนตายออกจากคัพพะของบั้วหลวงพันธุ่มุณทริก.....	50
4.2 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	53
4.3 การตรวจสอบพลาสมิดหลังจากการเชื่อมต่อกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	54
4.4 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	55
4.5 การตรวจสอบพลาสมิดหลังจากการเชื่อมต่อกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	56
4.6 โครงสร้างพลาสมิด pBI121DFR.....	57
4.7 โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301DFR.....	57
4.8 การให้คะแนนการติดสีน้ำเงินจากการทดสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay	59
4.9 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>NPTII</i> โดยใช้ไพรเมอร์ <i>NPTII</i>	63
4.10 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GUS</i> โดยใช้ไพรเมอร์ <i>GUS</i>	64
4.11 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>DFR</i> โดยใช้ไพรเมอร์ <i>CaMV35s to NOS</i>	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อ

2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid
BAP	: benzylaminopurine
BA	: 6-benzyladenine
<i>DFR</i>	: dihydroflavonal 4-reductase
GUS	: β -glucuronidase
<i>GUS</i>	: β -glucuronidase gene
MS	: Murashige and Skoog medium (1962)
NAA	: naphthalene acetic acid
<i>NPTII</i>	: neomycin phosphotransferase gene
PCR	: polymerase chain reaction
pH	: logarithm of reciprocal of hydrogen (H) ion concentration
PEG	: Polyethylene glycol
TDZ	: Thidiazuron
Tween 20	: polyethylene sorbitan
X-gluc	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
%	: percent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

บัวหลวงเป็นพืชสกุลหนึ่งที่ถูกค้นพบอย่างดีทั้งในประเทศไทย ประเทศในเขตร้อน เขต
อบอุ่น และเขตหนาว นอกจากจะนำดอกมาใช้ประโยชน์แล้ว ส่วนอื่นๆ ยังสามารถนำมาใช้
ประโยชน์ได้ด้วย เช่น ไหลหรือรากบัว นำมาเป็นอาหาร ใบบัวใช้ห่อของ กลีบดอกตากแห้ง ใช้ฆวน
บุหรี ต้มเป็นเครื่องยาไทย ใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้ไข้ แก้โรคตับ ใช้ทำเครื่องสำอาง เกสรตัวผู้ นิยม
นำไปใช้ทำยาหอม บำรุงหัวใจ ชงแทนชา เมล็ดบัว ใช้ประกอบอาหารคาว หวาน เป็นยาบำรุงกำลัง
แก้กษัย แก้อุจจาระร่วง สมานแผล แก้อ่อนในกระหายน้ำ ช่วยให้เจริญอาหาร ฝักที่แกะเมล็ดออก
แล้ว สามารถใช้ทำปุ๋ยหมัก ใช้เพาะเห็ด หรือนำไปเป็นส่วนผสมของยากันยุง ดีบัว เป็นยาสมุนไพร
ช่วยขยายหลอดเลือดหัวใจ แก้อาเจียนเป็นโลหิต แก้น้ำกามเคลื่อนขณะหลับ และแก้กระหาย เป็น
ต้น (กวิมหาภูต พลหาญ. 2534; เสริมลาภ วสุวัต. 2537; นันทวัน บุญยะประกฤษ. 2541) เนื่องจากบัว
เป็นพืชที่ปลูกง่าย และขึ้นได้ทั่วไป จึงพบว่ามีทั้งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ และที่มีผู้นำมาปลูกเพื่อเป็น
ไม้ประดับตามบ้าน ในกระถาง บ่อ หรือ คุน้ำ ตลอดจนปลูกเป็นจำนวนมากที่เรียกว่า นาบัว เพื่อเก็บ
เมล็ด และฝักอ่อนขาย เมื่อส่วนของใบแห้งลงจะเก็บส่วนของก้านใบหรือสายบัว และส่วนของไหล
หรือรากบัวขาย ในปัจจุบันนี้นิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอก และไม้ประดับเพื่อความสวยงาม (สุปราณี
วิชชานนท์. 2540) สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทยได้จัดบัวหลวงเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่ง
(วาสนา มิตรานนท์. 2527)

บัวหลวงพันธุ์บุญจริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นบัวหลวงสายพันธุ์หนึ่งที่มีดอกสี
ขาว ขนาดใหญ่ ปลายกลีบมีสีชมพูเรื่อๆ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) เป็น
บัวหลวงสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมนำมาใช้งาน แต่บัวหลวงมักมีปัญหาในด้านการใช้ประโยชน์ได้น้อย
วัน (จินตนา ไทยลิมทอง และ ลาวัลย์ สุทธิมนตรี. 2536) กลีบดอกจะเหี่ยวและร่วงเร็ว (สายชล เกตุษา.
2531; บุญเกื้อ หาราชย์. 2537) รูปทรงของดอกและสีมีให้เลือกจำกัด (จารีย์ หอยทอง. 2519)
เนื่องจากบัวหลวงที่สามารถปลูกได้ในประเทศไทยมีเพียง 2 สี คือ สีขาว และสีชมพู ดังนั้นการ
ปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สีใหม่ที่นอกเหนือจากสีเดิม เป็นการเพิ่มความหลากหลายให้กับบัวหลวง
มากยิ่งขึ้นจึงควรปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงให้มีคุณภาพดี (วิชัย ฐริปัญญาพานิช. 2543)

ในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชมีการนำเทคนิคในการตัดต่อยีนร่วมกับการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อมาใช้ เพื่อถ่ายยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงให้มีความ
หลากหลายของสีดอกและสามารถที่จะปลูกได้ในประเทศไทยโดยการถ่ายยีนนี้ จะใช้เชื้ออะโคร
เอกสาร์เป็นเอกสาร์ที่ส่งยีนเข้าสู่เซลล์พืช เพื่อการศึกษายีนนั้น เมื่อนำเนื้อเยื่อไปเพาะในหลอด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียเป็นพาหะ ทั้งนี้มีรายงานว่าเทคนิคการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะประสบความสำเร็จกับพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ (รงรอง หอมหวล, 2545) พิทูเนีย (Van der Krol *et al.*, 1990) ข้าว (กัลยาณี มีเพียร และ จริยา เบญจานุกรม, 2542) ข้าวโพด (กาญจนา ขจรเฉลิมศักดิ์ และ ปิยพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์, 2543) โดยการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนี้จะมีประสิทธิภาพหรือไม่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ และชิ้นส่วนของพืช สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงที่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก เพื่อหาวิธีการในการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวง และสีของดอกบัวหลวง เพื่อเพิ่มความหลากหลายของสีดอกให้มากขึ้น และมีความเหมาะสมที่จะสามารถปลูกได้ในประเทศไทย

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยวิธีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

1.2.2 เพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีน antisense *DFR* ที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อ

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

การใช้พลาสมิดที่ต่างกันร่วมกับอะโกรแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น และเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก อาจส่งผลให้การถ่ายยีนประสบความสำเร็จได้แตกต่างกัน และผลการถ่ายยีน antisense *DFR* อาจมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *DFR* ที่มีอยู่ในพืชเดิม ทำให้ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนนั้น มีการแสดงออกของสีดอกที่แตกต่างกันออกไป

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อนำยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อ อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีดอก โดยการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน antisense *DFR*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการใช้พลาสมิดที่ต่างกันร่วมกับอะโกราแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) และการตรวจสอบผลของการมีอยู่ของยีนหลังการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อ

1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

1.6.1 ศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ภายใต้ปัจจัยสีของแสงระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) ที่อยู่ในพลาสมิด 2 ชนิด คือ pBI121*DFR* และ pCAMBIA2301*DFR* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

1.6.2 ศึกษาผลของพลาสมิดที่ต่างกันในระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆร่วมกับการใช้อะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ในการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) ที่อยู่ในพลาสมิด 2 ชนิด คือ pBI121*DFR* และ pCAMBIA2301*DFR* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

1.6.3 ศึกษาผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนหลังการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก ในสภาพปลอดเชื้อ

1.7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ได้ชิ้นส่วนเริ่มต้น ที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

1.7.2 ทราบวิธีการที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

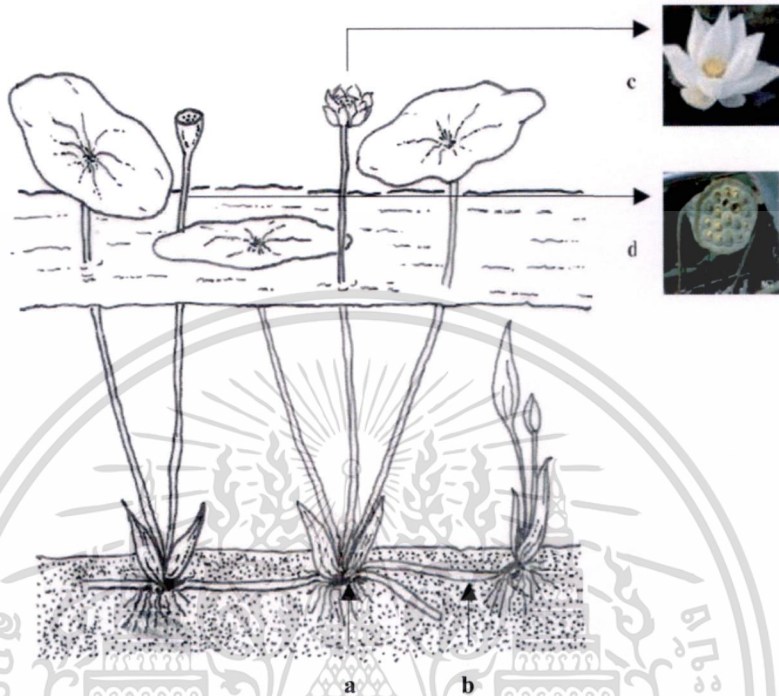
2.1 ความรู้เกี่ยวกับบัวหลวง และการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2.1.1 บัวหลวง

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

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Nelumbo* Adans. (Backer and Bakhuizen. 1963) พืชในสกุลนี้พบได้ทั่วไปมีทั้งหมด 2 ชนิดคือ ชนิดที่ 1 *Nelumbo nucifera* Gaertn. หรือ *Nelumbium speciosum* Will. หรือ *Nelumbo indica* Pers. หรือ *Nelumbium nelumbo* (L) Druce มีชื่อสามัญว่า Sacred lotus, East Indian lotus, Egyptian lotus (รัชนี้ จวีราช. 2532) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา เลขะกุล. 2535) อินเดีย เปอร์เซียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือ (สุเมธ อนุรักษ์. 2537 ; Gilbert. 1982) จีน ทิเบต (Core. 1955) และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย (Gilbert. 1982) เป็นบัวหลวงชนิดเดียวที่พบในประเทศไทย (สุชาติ ศรีเพ็ญ. 2530; ไชยา - ลาวัลย์. 2541) ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง (ภาพที่ 2.1) ลำต้นอยู่ใต้ดินใต้น้ำเรียกว่า เหง้า อยู่ในดินลึกประมาณ 5 - 15 เซนติเมตร ลำต้นอ่อนมีสีขาว หรือค่อนข้างแดงมีจุดประปราย มีระบบรากเป็นแบบรากฝอย เกิดตรงบริเวณส่วนข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีขาว และหวมกรากใหญ่ เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศขนาดใหญ่สีขาว มีลักษณะเป็นรูปไข่ปลายเรียว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) เรียกว่า ฝัก และในฝักมีเมล็ด เมล็ดมีเปลือกหุ้มบางสีขาวอ่อนนุ่ม ภายในมีใบเลี้ยงหนา มีสีขาวนวล 2 ใบ ไม่มี endosperm (exalbuminous seed) ต้นอ่อนมีสีเขียวเข้ม เรียกว่า ตีบัว (embryo) (จารีย์ หอยทอง. 2519) และชนิดที่ 2 *Nelumbo lutea* Pers. (Burkill. 1966; Core. 1955) เป็นบัวหลวงชนิดที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเหนือ มีลักษณะดอกและใบคล้ายกับบัวหลวงของไทย (ไชยา - ลาวัลย์. 2541) แต่ดอกมีขนาดสีเหลืองอ่อนขนาด 6 - 10 ดอก จะชูขึ้น 3 ฟุตจากพื้นน้ำ ใบมีสีน้ำตาลเงินอมเขียว และกว้าง 1 - 2 ฟุต ผลย่อยลักษณะค่อนข้างกลม (Gilbert. 1982; คณิตา เลขะกุล. 2535) เคยมีผู้พยายามนำมาปลูกในประเทศไทย แต่เนื่องจากว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลูกแล้ว ไม่สามารถออกดอกได้ อาจเพราะสภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่ร้อนเกินไป (กสิน สุวตะพันธ์. 2500; คณิตา เลชะกุล. 2535; ไชยา – ลาวัลย์. 2541)



ภาพที่ 2.1 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ได้แก่ (a) เหง้า (b) ใบ (c) ดอก (d) ฝัก
(สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์จิตรพันธ์. 2533)

2.1.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ยอด ใบ ราก ดอก ผล อับละอองเกสร และเซลล์ที่ปราศจากผนัง (protoplast) มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารที่จำเป็นต่อการพัฒนาพืช ในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจัดเป็นเทคนิคพื้นฐานที่นักปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี (นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546) โดยในการทดลองนี้จะใช้การเพาะเลี้ยงแคลลัสร่วมกับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

2.1.2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาราเนไคมา (parenchyma) ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ เซลล์มีขนาดต่างๆ มีรูปร่างไม่แน่นอนภายในเซลล์มีแวคิวโอล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(vacuole) จำนวนมาก ลักษณะของแคลลัสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ แคลลัสชนิดที่เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ แยกจากกันได้ง่าย เรียกว่า friable callus หรือ soft callus และอีกชนิดคือ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่นแยกออกจากกันได้ยาก เรียกว่า compact callus หรือ hard callus (คำานูญ กาญจนภูมิ. 2542; ปรศาสตร์ เกื้อมณี. 2538; รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541) ทุกส่วนที่มีชีวิตของพืช สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ส่วนที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในพืชใบเลี้ยงคู่คือ คัพพะ (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon) ลำต้น (stem) ส่วนเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ส่วนใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และราก (root) ส่วนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสคือ คัพพะ ใบอ่อน (young leaf) ดอกอ่อน (young flower) และเมล็ดที่เพิ่งเริ่มงอก นอกจากนี้เนื้อเยื่ออื่น เช่น แคมเบียม (cambium) คอร์เทก (cortex) เนื้อเยื่อส่วนในต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) และส่วนหัวของพืช เช่น มันเทศ แครอท ก็สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ปรศาสตร์ เกื้อมณี. 2538; รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส (ปรศาสตร์ เกื้อมณี. 2538; รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541)

1. ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยง แม้ไม่มีข้อจำกัด แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก แต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป
2. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้ โดยทั่วไปแล้ว ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำ จะพัฒนาไปเป็นยอด หรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุล จะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป สำหรับความเข้มข้นของออกซินที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือ 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซโตไคนินที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามีน (glutamine) แอสปาราจีน (asparagine) อาร์จินีน (arginine) พิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) ยีสต์ (yeast extract) และน้ำมะพร้าว (coconut milk) มีส่วนสำคัญต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย
4. แหล่งคาร์บอน (carbon source) ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) และน้ำตาลแซคคาไรส (saccharose) ความเข้มข้น 2 - 4 เปอร์เซ็นต์
5. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environment factor) ได้แก่ แสง อุณหภูมิ และออกซิเจน โดยเฉพาะแสง ต้องมีความเข้มข้นแสงต่ำ หรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส
6. สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง มักเจริญเติบโตได้น้อย และช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหาร ได้น้อยกว่า และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำแหน่งที่ขึ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารมีสารที่เป็นของเสียจากเมตาโบลิซึม ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

2.1.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวง

ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย (2539) ทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงในสภาพหลอดทดลอง โดยนำเมล็ดบัวหลวงอายุ 7 วันหลังดอกบาน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และศึกษาผลของออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ NAA 2,4-D และ dicamba ที่ความเข้มข้น 0 1 3 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า NAA สามารถชักนำแคลลัสได้ดีกว่า dicamba แต่ปริมาณแคลลัสที่ได้ก็ยังน้อยมาก ส่วน 2,4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อใช้ออกซินแต่ละชนิดร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ออกซิน ร่วมกับ TDZ ชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการใช้ออกซินเพียงอย่างเดียว โดยที่ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณแคลลัสสูงสุด ลักษณะแคลลัสเกาะกันหลวมๆ สี ฉ่ำน้ำ และมีสีน้ำตาลปนเขียว

จิตเกษม เทียงจิตต์ (2545) ทำการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์อนุชกริก พบว่าชิ้นส่วนตาไหลจากคัพพะ มีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงใน NAA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ ส่วนการใช้คัพพะอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงใน NAA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.15 ไมโครโมลาร์

ภักวดี ภักดีงาม (2548) ทำการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์อนุชกริก โดยนำชิ้นส่วนบริเวณก้านใบ และตายอดจากคัพพะ และตาจากไหล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ พบว่าทุกชิ้นส่วนสามารถเกิดแคลลัสได้ทั้งสามส่วน โดยชิ้นส่วนก้านใบ และตายอดจากคัพพะ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตาจากไหลชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยที่สุด

วิลาสินี ลิทวิทรัพย์ (2550) ทำการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์อนุชกริก ภายใต้ปัจจัยแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพพะเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่า ภายใต้แสงสีขาว ชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบ สามารถเกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุดคือ

3.80 คะแนน จากคะแนนสูงสุด 5.00 คะแนน โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ฉ่ำน้ำ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบ ภายใต้แสงสีแดง สามารถเกิดแคลลัส เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในแสงสีขาว ชิ้นส่วนก้านใบจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอด

รวิรัฐ บัวทอง (2552) ทำการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้ชิ้นส่วนก้านใบ และตายอดจาก คัพพะ พบว่าชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม NAA (α -naphthalene acetic acid) เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ [1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-UREA] เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) เข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 12 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัสได้ 43.33 เปอร์เซ็นต์

2.2 การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืช เป็นวิธีการสำคัญในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของพืช ให้แสดงออกในลักษณะพันธุกรรมตามที่ต้องการ โดยวิธีส่งถ่ายสารพันธุกรรมจากภายนอกเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย สารพันธุกรรมที่ทำการส่งถ่ายเกิดการแทรกเข้าเชื่อมต่อกับโครโมโซมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมาย และเกิดการแสดงออกในลักษณะทางพันธุกรรมนั้นต่อไปยังรุ่นลูก เหมือนในพืชปกติได้ พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจากแหล่งอื่นเข้าไปในส่วนของจีโนม และสามารถแสดงลักษณะทางพันธุกรรมที่ยีนนั้นควบคุม เรียกว่า พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plants)

2.2.1 เทคนิคการถ่ายยีน (gene transfer technique)

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชสามารถปฏิบัติได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาใช้ในการส่งถ่ายยีน แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ (อภิชาติ วรรณวิจิตร, 2547)

2.2.1.1 การส่งถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)

เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเป้าหมายโดยตรง เช่น

1. การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี เป็นการถ่ายยีนโดยผ่านโปรโตพลาสต์ โดยแยก

โปรโตพลาสต์จากพืช แล้วนำไปบ่มรวมกับสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ โดยนิยมใช้สาร Polyethylene glycol (PEG) ร่วมด้วย ซึ่ง PEG จะทำให้เยื่อหุ้มโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง ซึ่งมีโอกาสทำให้ดีเอ็นเอจากภายนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, 2548) โยชนด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) การถ่ายฝากยีนวิธีนี้จะทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยนำโปรโตพลาสต์มาบ่มด้วยสารละลายดีเอ็นเอหรือโครโมโซม แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปเพื่อทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้ดีเอ็นเอแทรกเข้าสู่เซลล์พืช (สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล. 2548) ตัวอย่างการถ่ายยีนโดยวิธีนี้ เช่น Kanrar *et al.* (2002) ทดลองถ่ายยีน *hevein* ซึ่งต้านทานต่อเชื้อ *Alternaria brassicae* เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ผลที่เกิดขึ้นจากการถ่ายยีนเข้าไปโดยวิธีนี้พบว่าเชื้อ *Alternaria brassicae* จะมีระยะพักตัวนานขึ้น และขนาดของบาดแผลที่เกิดจากเชื้อมีขนาดเล็กลง อัตราการเกิดโรคต่ำลง

3. การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) เป็นวิธีการใช้เข็มฉีดยาฉีดเข้าสู่โปรโตพลาสต์ ในพืชทำได้ยากกว่าในสัตว์ เนื่องจากพืชมีแวคิวโอลซึ่งเป็นที่เก็บเอนไซม์และสารพิษ ต้องระวังไม่ให้ถูกแวคิวโอลแตก เพราะมักจะทำให้เซลล์ตาย (สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล. 2548) ทั้งนี้ Sorokin *et al.* (2000) ทดลองถ่ายพลาสมิดที่มียีน *bar* และ *uidA* เข้าสู่โปรโตพลาสต์ข้าวสาลี ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดยา ผลที่เกิดขึ้นพบว่าวิธีการถ่ายยีนวิธีนี้มีประสิทธิภาพของการถ่ายยีนต่ำ คือ ประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของโปรโตพลาสต์ และสภาวะที่ใช้ในการถ่ายยีน

4. การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิง (particle gun หรือ microprojectile bombardment หรือ biolistic technique) เป็นวิธีการที่ใช้อนุภาคทังสเตนหรือทองขนาดเล็กเคลือบด้วยดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายเข้าสู่เซลล์ ใส่งในเครื่องยิงกระสุน อนุภาคที่ใช้จะแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายในและพาดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเข้าไปด้วย สามารถยิงอนุภาคเข้าไปได้เป็นพันอนุภาคในหนึ่งครั้ง ใช้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์โดยไม่ต้องทำเป็นโปรโตพลาสต์ สามารถถ่ายยีนไปยังออร์แกเนลล์โดยตรง เช่น ถ่ายยีนไปยังไมโทคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ (สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล. 2548) ซึ่ง Hue *et al.* (2006) ศึกษาการถ่ายโอนยีนโดยใช้เทคนิค particle bombardment เพื่อนำยีน *bar* ที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชชนิดกลูโฟซิเนตเข้าสู่ส่วนเอมบริโอจินิกเซลล์ของหญ้า wheatgrass สายพันธุ์ลูกผสม พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถถ่ายโอนยีนเข้าสู่ดีเอ็นเอเป้าหมายของหญ้า wheatgrass สายพันธุ์ลูกผสม ได้ 1.1 เปอร์เซ็นต์

Klein *et al.* (1987) ได้ใช้เครื่องยิงที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอของยีน *CAT* (chloramphenicol acetyltransferase) เข้าไปยังเซลล์ชั้นนอกสุดของเนื้อเยื่อต้นหอม (*Allium cepa*) และในปี ค.ศ. 1988 ได้ใช้เครื่องยิงเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงของข้าวโพด เมื่อนำเนื้อเยื่อทั้ง 2 มาวิเคราะห์ พบว่า มีกิจกรรมของยีน *CAT* แสดงว่าการใช้ปืนยิงสามารถส่งดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ได้

Dwight (1990) ได้ทดลองถ่ายยีน neomycin phosphotransferase II (*NPT II*) และ beta-glucuronidase (*GUS*) เข้าสู่ใบยาสูบโดยวิธีการใช้เครื่องยิงโมเลกุล ซึ่งผลที่ได้พบว่า ยีนดังกล่าวถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งเข้าสู่ใบยาสูบได้ และมีการแสดงออกของยีน *NPT II* และยีนนี้สามารถถ่ายทอดไปยังพืชรุ่นต่อไปได้

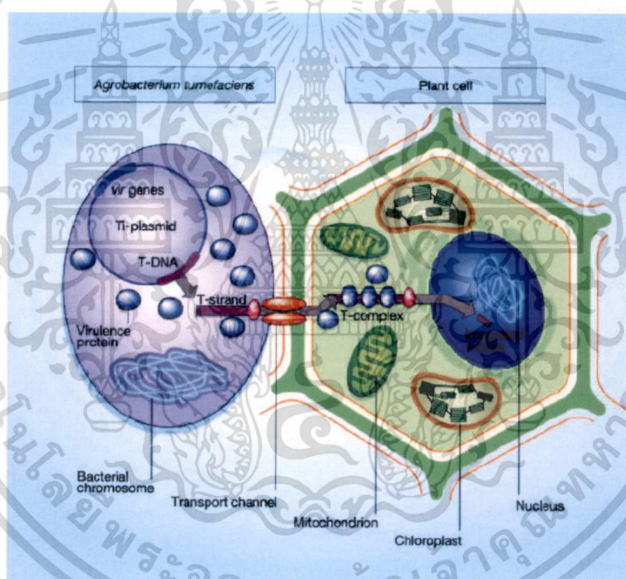
Chen *et al.* (1999) ได้ถ่ายยีน *EPSPs* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatase synthase) ซึ่งต้านทานยาปราบวัชพืชเข้าสู่อสมบรีโอซัวสาลี โดยการใช้เครื่องยิงโมเลกุลดีเอ็นเอ พบว่าสามารถสร้างพืชที่ต้านทานยาปราบวัชพืชได้ โดยยีน *EPSPs* ที่ถ่ายเข้าไปมีความคงตัวโดยเข้าร่วมตัวกับจีโนมของข้าวสาลี และสามารถถ่ายทอดยีนดังกล่าวไปยังรุ่นต่อไปได้

2.2.1.2 การส่งถ่ายยีนโดยใช้พาหะ (mediated gene transfer)

เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการโดยส่งถ่ายเข้าไปในพาหะ เช่น แบคทีเรีย หรือไวรัส ก่อนอาศัยกลไกของพาหะนำพาอินที่ที่ต้องการเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย เช่น การส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* (*Agrobacterium* mediated gene transfer) เป็นวิธีการนำอินที่ที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืช และเกิดกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างสารพันธุกรรมที่ทำการส่งถ่ายกับจีโนมของพืช โดยอาศัยกลไกการเข้าทำลายพืชของแบคทีเรียในดินที่ชื่อว่า *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียที่เข้าบุกรุก และเข้าทำลายพืชทางบาดแผล ทำให้เกิดลักษณะปุ่มปม หรือก้อนเนื้อในบริเวณนั้นของพืชหลายชนิด เรียกว่า crown gall disease และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถเจริญเติบโตได้ คือเจริญเติบโตได้เร็ว และโตได้ไม่จำกัด โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโต แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *A. tumefaciens* จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เนื่องจากมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid) ถูกถ่ายทอดเข้าไป และเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T-DNA (transferred DNA) พลาสมิด Ti ที่พบมากมี 2 ชนิด คือ ชนิดออกโทปีน (octopine) และ โนปาไลน์ (nopaline) มีส่วนของ virulence (*vir*) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์ของพืช ภายใน T-DNA จะมีอินที่กำหนดการสร้างสารโอปีน (opine) เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ในบริเวณที่ถูกบุกรุกจะมีการสร้างสารโอปีน ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน อะโกรแบคทีเรียม ก็สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไป พืชก็ยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร นอกจากอินที่กำหนดการสร้างสารโอปีนแล้ว ใน T-DNA ยังมีอินที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่เป็นสาเหตุให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และไม่จำกัดเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2548)

ขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำๆ 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) โดยทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตทางขวา (RB) ส่วนขอบเขตทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่จะส่ง และถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน *virulence* ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลไกการถ่ายโอนยีนโดยรวมของอะโกรแบคทีเรีย คล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ conjugation ของแบคทีเรีย โดยกระบวนการส่งถ่ายจะถูกกระตุ้นโดยสารประกอบอะซิโตไซริงโคน (acetosyringone) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน chromosomal *virulence (chv)* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และ *vir gene* ที่อยู่บนพลาสมิด โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *vir D* แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบดิเอ็นเอสายเดี่ยว ยีนที่อยู่ใน T-DNA ทั้งหมดเหมือนกับยีนของพืช แต่อยู่ใน พลาสมิดของแบคทีเรีย ยีนเหล่านี้มีโปรโมเตอร์ (promoter) ของพืช เทอร์มิเนเตอร์ (terminator) และตำแหน่งที่ใช้เติมเบส poly A ที่พบในยูคาริโอต ยีนเหล่านี้จะไม่มีอาการแสดงออกในเซลล์ของอะโกรแบคทีเรีย แต่แสดงออกในเซลล์ของพืชที่ได้รับ T-DNA (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2548) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช (Stanton. 2005)

การใช้พลาสมิด Ti เป็นเวกเตอร์สำหรับถ่ายฝากยีนให้กับพืชจะทำโดยแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช และสารโอฟินด้วยยีนที่ต้องการ เมื่อใส่ T-DNA เข้าสู่พืช พืชก็จะได้รับยีนที่สอดใส่ไว้แทน การถ่ายฝากยีนสู่เซลล์พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ใช้วิธีการเลี้ยงอะโกรแบคทีเรีย ร่วมกับโปรโตพลาสต์ หรือใช้ชิ้นส่วนอื่นๆของพืช เช่น ใบเลี้ยง ก้านใบ ลำต้นอ่อน แคลลัส ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อให้เกิดบาดแผล (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ (อ้างโดยกิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547)

2.3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย (bacterial strain)

การเลือกสายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียเป็นสิ่งสำคัญอันดับแรกในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่างๆ ถึงแม้ว่าอะโกรแบคทีเรียสามารถ infect เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงดูได้ก็ตาม แต่ก็มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดพืชด้วยเช่นกัน เช่น มีรายงานว่า อะโกรแบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่สามารถ infect เข้าสู่เนื้อเยื่อถั่วเหลืองได้ (Byrne *et al.* 1987) เนื่องจากยีน *vir* มีความจำเพาะเจาะจงต่อลักษณะทางสรีรวิทยา และพันธุกรรมของเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการทำงานของยีนกลุ่มนี้ต้องอาศัยการกระตุ้นจากสารที่ปล่อยออกจากบาดแผลของพืช

2.3.2 พันธุกรรมและสรีรวิทยาของชิ้นส่วนพืช (host genotype and explant physiology)

เนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดที่มีอายุต่างกัน ส่งผลให้มีอัตราการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ต่างกัน เช่น การทดลองของ Pang and Sandford (1988) ที่พบว่าเนื้อเยื่อใบของมะละกอจากต้นที่มีอายุมากกว่า 1 ปี จะมีอัตราการถ่ายยีนได้สูงกว่าเนื้อเยื่อใบที่มีอายุเพียง 40 วัน เนื่องมาจากเนื้อเยื่อใบจากต้นที่มีอายุมากจะประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ที่จับกันอย่างหลวมๆ ทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *A. tumefaciens* มากกว่าเนื้อเยื่อใบที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กรัดเรียงตัวอย่างหนาแน่นที่พบในใบที่มีอายุน้อยๆ

2.3.3 วิธีการทำบาดแผลบริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมาย

ความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ขึ้นกับความรุนแรงของเชื้อ ความจำเพาะเจาะจงของเชื้อต่อพืชอาศัย และเทคนิคการทำให้เกิดบาดแผลที่บริเวณเนื้อเยื่อเป้าหมาย ดังนั้นการถ่ายยีนด้วยวิธีนี้ควรมีเทคนิคในการทำให้เกิดบาดแผลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน ได้แก่

2.3.3.1 การทำบาดแผลโดยใช้มีดกรีด วิธีนี้นิยมใช้กับเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ เช่น บริเวณข้อ ใบเลี้ยง หรือส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญอื่นๆ โดยใช้ใบมีดผ่าตัดกรีดเป็นรอยหลายๆรอย ก่อนการปลูกเชื้อ

2.3.3.2 การทำบาดแผลโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) วิธีนี้เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็ก หรือยังไม่มีการกำหนดบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญอย่างแน่ชัด เช่น ใบเลี้ยงอ่อน หรือเนื้อเยื่อที่มีชอกมูมมาก เช่น multiple shoots คลื่นเสียงความถี่สูง มีผลทำให้เนื้อเยื่อที่ผิวปริแตกเกิดเป็นแผลเล็กๆ จำนวนมากทั่วทั้งผิว ทำให้เชื้อสามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ง่าย ระยะเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อคุณดูเห็นหน้าใบเขียวระบุชื่อหน้าการคำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

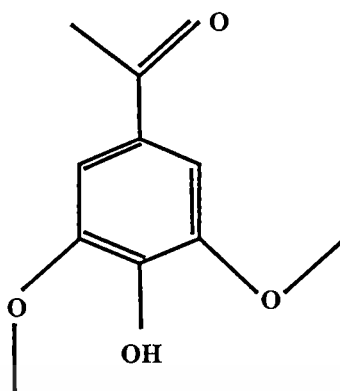
ในการให้คลื่นเสียงกับเนื้อเยื่อ และความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิด และขนาดของเนื้อเยื่อ

2.3.3.3 การทำบาดแผลโดยใช้ silicon carbide เนื้อเยื่อที่เหมาะสมควรเป็นเนื้อเยื่อที่ชอก มุมน้อย มีขนาดเล็ก เช่น somatic embryo หรือ zygotic embryo เซลล์ และเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

2.3.3.4 การใช้สูญญากาศ (vacuum) ร่วมกับการทำให้เกิดบาดแผล วิธีนี้เป็นารเพิ่มโอกาสให้เชื้อเข้าถึงบริเวณเป้าหมายได้มากขึ้น โดยเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีชอกมุมมาก ซึ่งเป็นบริเวณที่ กักเก็บอากาศไว้ จึงกลายเป็นเครื่องป้องกันไม่ให้เชื้อแบคทีเรียเข้าถึงเนื้อเยื่อพืชได้ ระยะเวลาการใช้ สภาพสูญญากาศอยู่ในช่วง 10 – 20 นาที นอกจากนี้ยังสามารถใช้สูญญากาศช่วยในการปลูกเชื้อ โดยตรง โดยไม่ต้องทำบาดแผลบนเนื้อเยื่อ เรียกวิธีการนี้ว่า vacuum infiltration technique วิธีนี้มัก ทำกับช่อดอกที่อยู่ในระยะดอกอ่อน โดยนำช่อดอกจุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย จากนั้นทำให้เกิดสูญญากาศ เชื้อแบคทีเรียจะแทรกเข้าสู่ภายในดอก และเข้าสู่รังไข่ นอกจากช่อดอกแล้ว ยังสามารถใช้ละอองเกสรที่กำลังงอกเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายได้ โดยนำละอองเกสรมาแช่ในสารละลาย เพื่อกระตุ้นให้หลอดละอองเกสรงอกออกมา แล้วใส่เชื้อพร้อมกับการทำ สูญญากาศ เพื่อให้เชื้อเข้าไปติดอยู่กับหลอดละอองเกสร จากนั้นนำละอองเกสร ไปผสมกับดอกปกติ (Jacobsen, 1993)

2.3.4 อะซิโตไซริงโกน (acetosyringone)

อะซิโตไซริงโกน มีชื่อทางเคมีว่า 3', 5' dimethoxy 4' hydroxyl acetophenone มีสูตร โครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 2.3 อะซิโตไซริงโกนเป็นสารที่อะโกรแบคทีเรียต้องการใช้ในการ สร้างปุ่มปม (Stachel *et al.* 1985) สารนี้สร้างขึ้นระหว่างเซลล์พืชเกิดบาดแผล และมีผลช่วยกระตุ้น การลกรหัสของยีน *vir* ในอะโกรแบคทีเรีย โดยทำงานร่วมกับ transmembrane receptor protein (Melcher *et al.* 1989) และสารประกอบฟีนอลอื่นๆ เช่น coniferyl alcohol และ sinapinic acid นอกจากนี้ น้ำตาล อุณหภูมิ และความเป็นกรด เป็นค่าของอาหาร ยังมีผลต่อความรุนแรงของ อะโกรแบคทีเรีย (Spence and Towers, 1988 ; Melcher *et al.* 1989 ; Alt-Moerbe *et al.* 1988) อะซิโตไซริงโกนมีประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยเติมอะซิโตไซริงโกน ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Sheikholeslam and Week, 1987) หรือเติมระหว่างการบ่มเชื้อ (co-cultivate) (Owens and Smigcki, 1988 ; Godwin *et al.* 1991)



ภาพที่ 2.3 สูตร โครงสร้างทางเคมีของ acetosyringone (Pherobase. 2005)

2.3.5 สภาพการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย (co-cultivation conditions)

2.3.5.1. สภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์พืชให้เป็นเซลล์ที่พร้อมจะทำการถ่ายยีน ทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพ

2.3.5.2. สภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย เนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิด หรือแม้แต่ในพืชต้นเดียวกัน เมื่อนำมาทำการถ่ายยีน โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* อาจต้องการระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียต่างกัน เช่น ในถั่วดินเตา พบว่าระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเชื้อแบคทีเรียนานเกิน 5 วัน เนื้อเยื่อพืชจะเกิดการม้วนงอ ทำให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อมาก อัตราการถ่ายยีนจะลดลง (De Kathen and Jacobsen. 1990) และในถั่วอัลฟัลฟาที่เวลา 4 วัน จะมีอัตราการถ่ายยีนสูงกว่าที่ 2 และ 3 วัน แต่มีปัญหาในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนชิ้นส่วนพืชเป็นอย่างมาก (Chabaud *et al.* 1988)

2.3.6 ผลของ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังจากการถ่ายยีน

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย มีความจำเป็นจะต้องกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียให้หมดภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการถ่ายยีน ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะหลายชนิดในการกำจัด ได้แก่ คาร์บินิซิลิน (carbenicilin) ซีโฟแทคซิม (cefotaxime) และพาโรโมมายซิน (paromomycin) เนื่องจากสารปฏิชีวนะจะเข้าจับกับ penicillin binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีองค์ประกอบของ inner membrane ใช้ในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย โดยสารปฏิชีวนะ ซีโฟแทคซิม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าคาร์บินิซิลิน (Mathais and Boyd. 1986)

2.3.7 ยีนเครื่องหมาย และยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช

2.3.7.1 ยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือก (selectable marker gene)

เป็นยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ สามารถใช้ในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป ซึ่งจะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะนั้นๆ และใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกเซลล์ เพื่อตรวจสอบการถ่ายฝากยีน เช่น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548)

1. ยีน *HPTII* (hygromycin phosphotransferase) เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (hygromycin) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่ม aminoglycoside สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รา และเซลล์ยูคาริโอต โดยมีความสามารถในการยับยั้งโปรตีน เนื่องจากไฮโกรมัยซิน จะไปขัดขวางการจดจำตำแหน่งของ aminoacyl tRNA และการเข้าเกาะที่ตำแหน่ง A-site ของ ribosome พืช โดยทั่วไปมักมีการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมากกว่ากานามัยซิน เช่น ในยาสูบ *Arabidopsis* ข้าวโพด ข้าว และพืชวงศ์หญ้าต่างๆ โดยทั่วไปแล้วพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Potrykus and Spangenberg. 1995) อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ชนิดอาหารในการคัดเลือกก็มีผลต่อพืชด้วยเช่นกัน โดย Lin *et al.* (1996) พบว่าเมื่อใช้อาหารแข็งที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารคัดเลือก มีผลยับยั้งการพัฒนาด้านยาสูบ แต่ถ้าคัดเลือกโดยใช้อาหารเหลว พบว่าความเข้มข้นเพียง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ เนื่องจากชั้นเนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารที่มีสารปฏิชีวนะทั้งชั้นเนื้อเยื่อ ทำให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าในอาหารแข็งที่สัมผัสเพียงบางส่วน

2. ยีน *NPTII* (neomycin phosphotransferase) ได้มาจาก *Escherichia coli* เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) neomycin geneticin และ paramomycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่ม aminoglycoside เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้พืชไม่สามารถสร้างโปรตีน เพื่อนำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆของเซลล์ได้ จึงทำให้เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ตาย มีรายงานการนำสารปฏิชีวนะกานามัยซินมาใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชหลายชนิด เช่น พืชเนื้อเยื่อ และยาสูบ (Fraley *et al.* 1983) นอกจากนี้การตอบสนองของพืชต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จะขึ้นกับชนิด และชิ้นส่วนของพืช ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด จะมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้สูง การใช้สารนี้จึงต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง เพื่อให้สามารถกำจัดเซลล์ปกติทั้งหมด เช่น พืชในวงศ์หญ้า (*Gramineae*) เซลล์ปกติจะตายหมด เมื่อใช้ความเข้มข้นของกานามัยซินมากกว่า 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และข้าวจะใช้ความเข้มข้นของกานามัยซินมากกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของกานามัยซินเพียง 35 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เนื้อเยื่อของการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brassica napus L. ตายหมด (Charest *et al.* 1988) อย่างไรก็ตาม โดยส่วนใหญ่แล้วความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะอยู่ในช่วง 50-300 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นการถ่ายยีนในยาสูบ ใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน (Horsch *et al.* 1985)

2.3.7.2 ยีนรายงานผล (reporter gene)

เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบได้ว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับยีนนั้น มีการแสดงออกหรือไม่ และมีการแสดงออกได้มากน้อยในเซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้นๆ (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2548) โดยปกติยีนจะติดอยู่กับโปรโมเตอร์ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนนี้มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของยีนรายงานผล และยีนรายงานผลที่นิยมใช้ คือ ยีน *GUS* หรือ *uid A* เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ β -glucuronidase จากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ K12 (ปรีชา ประเทพา. 2543) มีความจำเพาะเจาะจงกับ substrate คือ x-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) ผลที่ได้จะแสดงออกในรูปสารสีน้ำเงิน ส่วนยีนที่สามารถตรวจสอบได้โดยการเรืองแสง เช่น ยีน *LUC* ได้จากหิ่งห้อย สายพันธุ์ North America fire fly (*Photinus pyralis*) เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ luciferase สามารถทำการตรวจสอบได้ง่าย โดยนำเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับสาร luciferin แล้วตรวจผลการแสดงออกในรูปสารเรืองแสง (Nilsson *et al.* 1992) และยีน *GFP* เป็นยีนที่ได้จากแมงกะพรุน *Aequorea victoria* สร้างโปรตีน green fluorescent protein (GFP) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Khan and Maliga. 1999) โดยยีนรายงานผลที่ใช้ในพืชแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างของยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2548)

ยีนรายงานผล	เอนไซม์ที่สร้างได้
<i>CAT</i>	chloramphenical acetyltransferase
<i>GUS</i>	beta-glucuronidase
<i>NOS</i>	nopaline synthase
<i>LUC</i>	luciferase
β - <i>GAL</i>	beta-galactosidase
<i>GFP</i>	green fluorescent protein

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

พัชรินทร์ เจริญวุฒิชัยธรรม เรณู เย็นเกษ และวิไลพร เคลือบหิรัญ (2540) ศึกษาการงอกเป็นต้น และการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* ในข้าวพันธุ์ไทย พบว่าข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 และสุพรรณบุรี 60 ควรใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ O.D 0.01 และแคลลัสอยู่ในช่วง 7 – 11 วัน อาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงร่วมในการถ่ายยีนคือ NBI ที่มีอะซิโตไซลิงโกน เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และทำการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยวิธี *GUS* assay ปรากฏว่าอะโกรแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถถ่ายยีนได้

ชุตินา ประเสริฐสินธุ์ ประชา กองสุข และปัญญาธิ์ คุมพล (2541) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าผลของการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ในแคลลัสข้าว 4 สายพันธุ์ และเซลล์แขวนลอย 3 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส พบว่าข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ และพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเชื้อ EHA 105 พันธุ์ชัชนาท ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในเชื้อ EHA 105 และพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเชื้อ AGL-1 ส่วนการถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิวให้ผลการถ่ายยีนที่ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเชื้อ AGL-1 พันธุ์ขาวดอกมะลิให้ผลการถ่ายยีนที่ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในเชื้อ LBA 4404 และพันธุ์ปทุมมาติ ให้ผลการถ่ายยีนที่ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเชื้อ EHA 105

กัญญาณี มีเพียร และ จริยา เบญจานุกรม (2542) ศึกษาการถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าว 4 พันธุ์ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์เป็นพาหะ พบว่าผลของการถ่ายยีนจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ของข้าว และสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยเชื้อสายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุดในข้าวพันธุ์ กข 6 พันธุ์ชัชนาท และพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ส่วนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เชื้อสายพันธุ์ AGL-1 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงสุด

ประสิทธิ์ ศรีอริยะวงศ์ และ พงศธร กิมเฮง (2542) ศึกษาผลการถ่ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL-1 และ EHA 105 มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนมากที่สุดในคัพพะอายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ที่ประกอบด้วยอะซิโตไซลิงโกน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กาญจนา ขจรเฉลิมศักดิ์ และ ปิยพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์ (2543) ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวโพดโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียและเครื่องยิงยีน พบว่าอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และสายพันธุ์ AGL-1 ที่ O.D 0.01 ที่ถ่ายลงในแคลลัสอายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6 ประกอบด้วยอะซิโตไซลิงโกนเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน 90 และ 80 การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ LBA 4404 ที่ O.D 0.01 ที่ถ่ายลงในแคลลัสอายุ 3 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของอะซิโตไซลิ่งโกน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน 80 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงยีน พบว่าสามารถถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อข้าวโพคได้

ปราการ กระถินทอง สุกัญญา สำลีทอง และ สุนิสา วนาวงษ์ศรี (2543) ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียและเครื่องยิง โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 ใช้เพื่อเพิ่มความเข้มข้น O.D ที่ 0.1 และ 0.01 และเติมอะซิโตไซลิ่งโกนเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากผลการทดสอบ *GUS* พบว่า ผลของการถ่ายยีนจะต่างกันไปตามสายพันธุ์ของข้าว สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ความเข้มข้นของอะซิโตไซลิ่งโกน และอายุของแคลลัส ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนของข้าว พันธุ์เจ้าหอมคลองหลวง 1 คือ AGL-1 ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ค่า O.D ที่ 0.1 อะซิโตไซลิ่งโกนเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และอายุแคลลัส 9 วัน ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 คือ EHA 105 ความเข้มข้น O.D ที่ 0.1 และ 0.01 อะซิโตไซลิ่งโกนเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และอายุแคลลัส 7 วัน สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงยีนเป็นการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งประสบปัญหาทางเทคนิคหลายขั้นตอน จึงยังต้องมีการพัฒนา และปรับปรุงประสิทธิภาพต่อไป

ฐิติมา วงษ์การคำ และ สุภาลัย ไชยสุด (2544) ศึกษาผลของการถ่ายยีนในหญ้าโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย พบว่าอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 และมีอะซิโตไซลิ่งโกนที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนเข้าไปในแคลลัส และชิ้นส่วนของหญ้าได้ดีที่สุด คือบริเวณข้อปล้อง

เทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ และธำรงค์ เงามู่ทอง (2544) ศึกษาการถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ AGL-1 EHA 105 และ LBA 4404 และใช้สารชักนำคือ อะซิโตไซลิ่งโกนเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากผลการทดสอบ *GUS* พบว่าการถ่ายยีนของข้าวเหนียวดำ และข้าวสันป่าตอง ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และความเข้มข้นของอะซิโตไซลิ่งโกน 100 ไมโครโมลาร์ เหมือนกัน ต่างกันที่อายุแคลลัส คือข้าวเหนียวดำ อายุของแคลลัส 5 วัน และข้าวเหนียวสันป่าตองอายุแคลลัส 10 สัปดาห์

รรรอง หอมหวล (2545) ทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) พันธุ์ Carl Red โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (A281/pBI121) เป็นพาหะ ซึ่งพลาสมิด A281/pBI121 มียีน *GUS* เป็นยีนเครื่องหมาย และมียีน *NPTII* เป็นตัวคัดเลือกยีนที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่าสามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซิน ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแคลลัสทั้งหมด เมื่อนำแคลลัสที่ต้านทานต่อกานามัยซิน เหล่านี้มาทดสอบการแสดงออกของ *GUS* พบจุด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สื่อน้ำเงินบนก้อนแคลลัสและภายในเซลล์ จากนั้นนำแคลลัสที่ได้รับยืนยันเหล่านี้ไปตรวจสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อย เพื่อยืนยันการถ่ายยีนของอะโกรแบคทีเรียม หลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส แล้วพบแถบที่แสดงยีน *GUS* ที่ระดับ 1.2 kb และแถบที่แสดงยีน *NPTII* ที่ระดับ 0.7 กิโลเบส ในแคลลัสที่ได้รับยืนยันที่ตรวจสอบ

รัตนา ขามฤทธิ์ และคณะ (2549) ได้ทำการทดลอง การส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อย โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม แคลลัสร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียม คือ 90 นาที เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้วิธี gus assay พบการแสดงออกของยีน *GUS* ในส่วนของแคลลัสอ้อยที่ผ่านการคัดเลือก

Li *et al.* (2002) ทำการศึกษาผลความแตกต่างจากระดับความเข้มข้นของกานามัยซิน (10-250 มิลลิกรัมต่อลิตร) คาเบนซิลลิน (250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซีโฟแทกซีม (250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร) และการรวมกันของคาเบนซิลลิน และซีโฟแทกซีม (อย่างละ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบการเจริญใหม่ของเนื้อเยื่อของกุหลาบที่ต่างกัน (*Rosa hybrida* cv. Carefree Beauty) ประกอบด้วยส่วนของใบ แคลลัสที่ยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ และแคลลัสที่จะพัฒนาไปเป็นออบริโอจีนิสแคลลัส โดยมีพลาสมิด pCAMBIA2301 ที่บรรจุยีน *uidA* มียีน *GUS* เป็นยีนแสดงผล มี CaMV35S เป็นโปรโมเตอร์ และ ยีน *NPTII* ด้านทานกานามัยซิน และใช้ *A. tumefaciens* strain GV3101 ในการถ่ายยีนในใบ แคลลัสที่ยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ และแคลลัสที่จะพัฒนาไปเป็นออบริโอจีนิสแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนที่มีการถ่ายยีนจะมีผลการแสดงออกของ *GUS* โดยพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้นี้ เป็นการชักนำจากแคลลัสที่จะพัฒนาไปเป็นออบริโอจีนิสแคลลัส โดยมีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนของยีนที่ถ่ายเข้าไปมีความสม่ำเสมอ ยืนยัน โดยวิธีพีซีอาร์ และ เซาร์เทิร์น ไฮบริไดเซชัน (Southern hybridization)

Agarwal *et al.* (2004) ทำการทดลองวิธีการที่มีผลต่อการถ่ายยีนของ *Morus alba* L. โดยใช้ *A. tumefaciens* โดยนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่ได้จากการเจริญจากคั่นกล้าไปเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA 4404 ที่มี vector pBI121 ที่มียีน *GUS* และ *NPTII* ในระหว่างการ pre-conditioning และ co-cultivation ในเวลา 48 ชั่วโมง มีความถี่ของการถ่ายยีนสูงที่สุดเท่ากับ 18.60 เปอร์เซ็นต์ และการแสดงออกนี้ถูกยืนยัน โดยการทดสอบ histochemical และวิธีพีซีอาร์

Mahadtanapuk *et al.* (2005) ทำการทดลองวิธีการทำให้เกิดต้นใหม่ และการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาพันธุ์ Chiang Mai Pink โดยใช้ retarded shoot เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยตัดชิ้นส่วนขนาด 0.5x0.5x0.5 เซนติเมตร แล้วเลี้ยงร่วมกับ (co-cultivate) *A. tumefaciens* strain AGLO ซึ่งมี binary vector คือ pBI121 หรือ pBI121-Ca-ACS1 นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ในที่มีด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 วัน แล้วย้ายลงใน MS ที่เติม IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร IMA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กานามัยซิน 50 การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

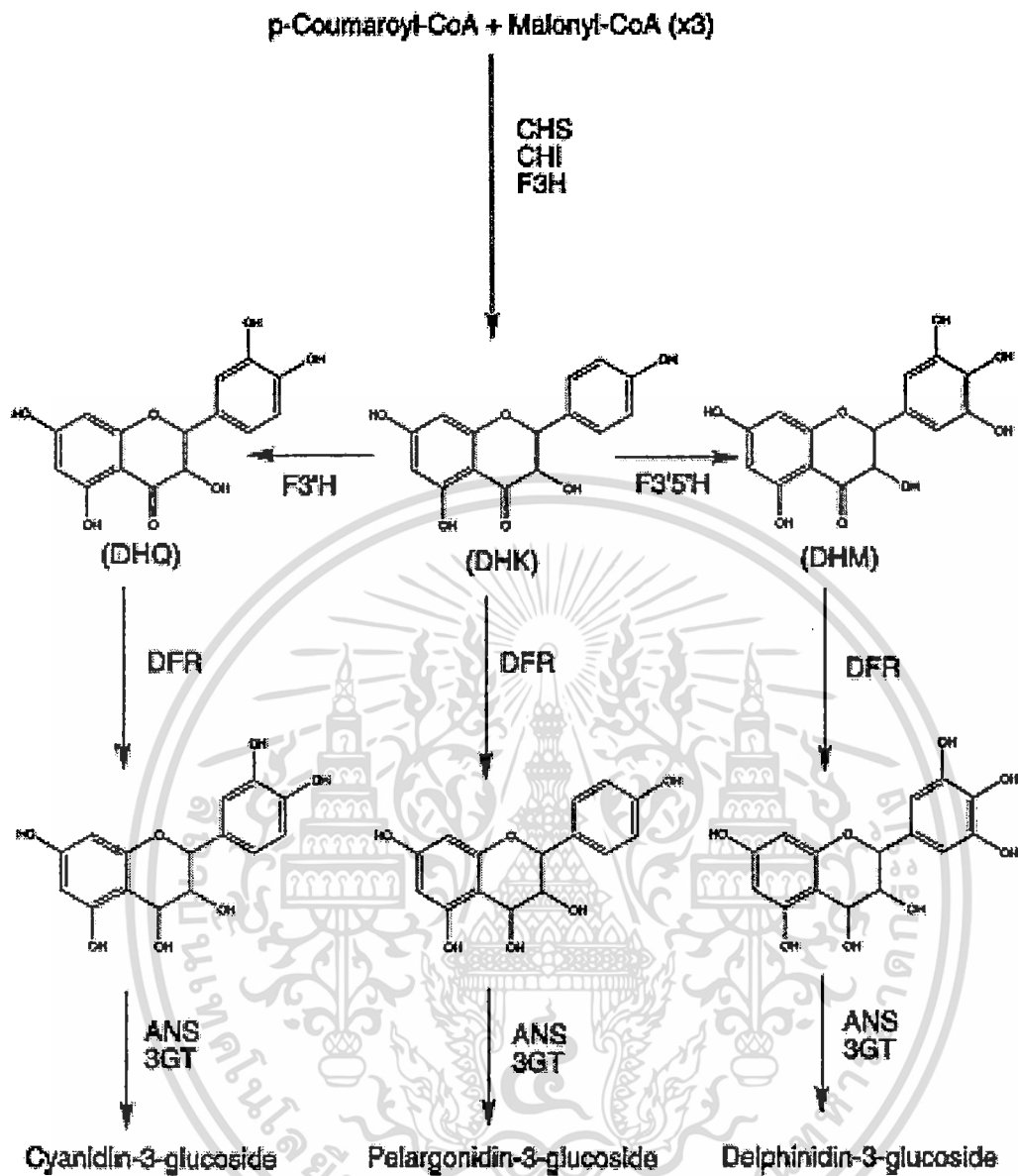
มิลลิกรัมต่อลิตร และ แวนโคมัยซิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการ subculture ขึ้นส่วนพืชทุกๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นตายอดเกิดขึ้น แล้วจึงย้ายเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ให้แยกส่วนของยอดออก และเลี้ยงบน MS ที่เติม IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (subculture ทุกๆ 2 สัปดาห์) ตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และเซาเทิร์นบลอต (Southern blot) ตรวจสอบการแสดงออกของ *GUS* เพื่อตรวจสอบการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่า ใต้พืชที่ถูกถ่ายยีนเป็นผลสำเร็จ ภายในระยะเวลา 3 เดือน หลังจากเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* และมีความถี่ที่เกิดการถ่ายยีนมากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเหมาะสมต่อการนำไปใช้จริง

Lee *et al.* (2006) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่อีมบริโอจินิกแคลลัสของ orchardgrass โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (สายพันธุ์ EHA101 GV3101 และ LBA4404) ที่มีพลาสมิด pIG121Hm และเพิ่มการเติมอะซิโตไซริงโคน ในขั้น inoculation และ co-cultivation พบว่าสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีที่สุด คือ สายพันธุ์ EHA101 รองลงมา คือ GV3101 และ LBA4404 ตามลำดับ สารอะซิโตไซริงโคนมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน *GUS* เห็นได้จากเมื่อเติมอะซิโตไซริงโคนเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ในขั้นตอนการ inoculation และ co-cultivation จะส่งผลให้ ยีน *GUS* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในส่วนเนื้อเยื่อแคลลัสที่ทำกรถ่ายยีน 16-56.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และเซาเทิร์นบลอต พบว่ามียีนเป้าหมายปรากฏอยู่ในต้นพืชที่ทำกรทดลองจำนวน 1 หรือ 2 โคลน ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน 4.8 เปอร์เซ็นต์

Qiu *et al.* (2006) ทำการถ่ายยีน CsZCD (Crocus zeaxanthin 7,8-cleavage dioxygenase) เข้าสู่มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) Micro-Tom โดยวิธีการใช้อะโกรแบคทีเรีย จากการทดลองนี้ ใช้ชิ้นส่วนจากใบเลี้ยง เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี zeatin เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำชิ้นส่วนแช่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 20 นาที และที่ไม่เลี้ยงในอะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 3 วันบนอาหารเดียวกัน หลังจากนั้น นำมาเลี้ยงในอาหารเดียวกันที่มีการเติมซิโฟแทกซิมเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน และย้ายลงอาหารที่มีกานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ คาราบิเนลีนเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 – 8 สัปดาห์ โดยความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้มีค่าที่ต่างกันคือความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ที่มีค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 0.5 และ 1.0 ผลที่ได้คือ มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนที่มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.2 และให้ผลที่ดีกว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 และ 1.0 ส่วนการตรวจสอบการแทรกของยีนใช้ตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากวิธีการนี้เป็นวิธีที่ให้ผลสำเร็จมากในการผลิต มะเขือเทศ Micro-Tom ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน CsZCD ในการสังเคราะห์ carotenoid ภายใต้โปรโมเตอร์ที่สร้างขึ้น วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และใช้ได้ทั่วไปกับการถ่ายยีนในมะเขือเทศเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การถ่ายยีนควบคุมสีดอกด้วย dihydroflavonol 4-reductase (DFR)

การปรับปรุงสีของดอกไม้ โดยวิธีการถ่ายยีนนั้น เริ่มต้นจากการโคลนยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับขบวนการชีวสังเคราะห์ flavonoids และ anthocyanins ซึ่งสรุปได้ดังภาพที่ 2.4 คือ ขั้นตอนแรก ที่เข้าสู่ชีวสังเคราะห์ flavonoids เกิดจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของ molonyl CoA 3 โมเลกุล และ *p*-coumaroyl CoA 1 โมเลกุล โดยใช้เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตเป็น naringenin chalcone ซึ่งมีสีเหลือง ขั้นที่สองเป็นการทำ isomerization ของ chalcone โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้ผลผลิตเป็น naringenin flavanone ที่ปราศจากสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone 3' hydroxylase (F3'H) ให้สารกลุ่ม dihydroflavonol คือ dihydrokaempferol (DHK) สารประกอบนี้อาจได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งต่างๆ เพิ่มเติม โดยเอนไซม์ flavonoid 3'hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) และให้สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวง B นี้มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็ดสีที่แตกต่างกัน สารกลุ่ม dihydroflavonol ต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ขั้นตอน สำหรับเปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่ม anthocyanins เริ่มจากการกระตุ้นการรีดิวซ์สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ทั้ง 3 ชนิด ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol 4- reductase (DFR) ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ทำให้ได้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin ได้แก่ leucopelargonidin leucocyanidin และ leucodelphinidin ซึ่งจะถูกรีดิวซ์, dehydration และ glycosylation ให้สารกลุ่ม anthocyanin ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน เช่น pelargonidin (ส้ม ถึงแดงอิฐ) cyanidin (แดงถึงชมพู) และ delphinidin (ม่วงถึงน้ำเงิน) (Johnson *et al.* 2001) โดยยีน *DFR* สามารถโคลนได้จากดอกของ *Dahlia variabilis* (Fischer *et al.* 1988) *Petunia hybrida* (Forkman and Ruhnau. 1987) และ *Antrirrhinum majus* (Martin *et al.* 1985, Beld *et al.* 1989) เป็นต้น ซึ่ง *DFR* ที่ได้จากพืชต่างชนิดกัน ก็สามารถนำมาใช้ในการตัดแปลงพืชที่ต้องการให้เกิดความหลากหลายของสีดอกได้ (Johnson *et al.* 2001)



ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีที่เร่งปฏิกิริยาโดย dihydroflavonol 4-reductase.

CHS: chalcone synthase, F3H: flavanone 3-hydroxylase, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H: flavonoid 3'5' hydroxylase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase, ANS: anthocyanin synthase, 3GT: flavonoid 3-glucosyltransferase. (Johnson *et al.* 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Meyer *et al.* (1987) ได้สร้างพืชเนียบแปลงพันธุ์ที่ให้ดอกสีแดงอิฐ โดยปกติพืชเนียบจะไม่มีดอกที่ให้โทนสีส้ม เนื่องจากเอนไซม์ *DFR* ของพืชเนียบไม่สามารถเปลี่ยนสาร dihydrokaempferol เป็นสาร leucopelargonidin ที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง pelargonidin ซึ่งเป็นสารที่ให้สีส้มได้ ดังนั้นจึงทำการถ่ายพลาสมิด p35A1 ที่มียีน *DFR* ที่โคลนได้จากข้าวโพดที่ต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ CaMV35S และ เทอร์มิเนเตอร์ NOS เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของพืชเนียบสายพันธุ์ RL01 ซึ่งมีดอกสีชมพูอ่อน โดยพืชเนียบสายพันธุ์นี้เป็นพวกที่มีการกลายพันธุ์ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้เปลี่ยนสาร dihydrokaempferol เป็นสาร dihydroquercetin ทำให้มีการสะสมของสาร dihydrokaempferol ดังนั้นเมื่อถ่ายยีน *DFR* ของข้าวโพดเข้าไป เอนไซม์ *DFR* นี้จึงสามารถเปลี่ยนสาร dihydrokaempferol ที่สะสมอยู่ ทำให้ได้พืชเนียบสีแดงอิฐขึ้น

Napoli *et al.* (1990) ได้ถ่ายยีน *CHS-a* ที่โคลนได้จากพืชเนียบแบบ sense และ antisense เข้าสู่พืชเนียบสายพันธุ์ V26 ซึ่งมีดอกสีชมพูอ่อน และพืชเนียบสายพันธุ์ R18 ซึ่งมีดอกสีม่วงน้ำเงิน โดยใช้เวกเตอร์ pFLG5972 ซึ่งประกอบด้วยยีน *CHS* แบบ sense ควบคุมโดยโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS และเวกเตอร์ pFLG7010 ประกอบด้วยยีน *CHS* แบบ antisense ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS เช่นเดียวกัน โดยใช้วิธีการถ่ายยีนด้วยเชื้อแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย พบว่าพืชเนียบทั้งสองชนิดต่างมีสีดอกที่อ่อนลง หรือได้ดอกที่มีสีขาวยังดอก หรือดอกมีสีขาวยางบางส่วน

Jonsson *et al.* (1999) ได้ถ่ายยีน *DFR* ที่โคลนได้จากกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียมเข้าสู่พืชเนียบเพื่อศึกษากลไกการทำงานของยีน พบว่ายีน *DFR* ที่ใส่เข้าไปไม่สามารถเปลี่ยนสาร dihydrokaempferol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร pelargonidin ซึ่งเป็นสารที่ให้สีส้มได้ ดังนั้นในกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียมจึงมีดอกโทนสีชมพูหรือแดง แต่ไม่มีดอกโทนสีส้ม

Martens *et al.* (2002) ทำการทดสอบการแสดงออกของยีน *DFR* ที่โคลนได้จาก cDNA ของ เหยบิรา ผีเสื้อ กุหลาบ สต็อค มะเขือเทศ และ แก้วชวย ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* 'SR1'), ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ INV Sc1) และแบคทีเรีย (*Escherichia coli* สายพันธุ์ GI724) พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ *DFR* ขึ้น และสามารถเปลี่ยนสาร dihydrokaempferol ที่ติดฉลากด้วยคาร์บอน 14 ไปเป็น leucoanthocyanidins ที่มีคุณภาพและปริมาณสูงในระบบการแสดงออกของยีสต์ และโปรโตพลาสต์ของยาสูบ สำหรับใน *E. coli* ไม่พบการแสดงออกของยีนเหล่านั้น

Polashock *et al.* (2002) ได้โคลนยีน *DFR* จาก genomic library ของแครนเบอร์รี่ (cranberry) ด้วยโพรบของยีน *DFR* จากมะเขือเทศ เมื่อถ่ายยีนที่ได้เข้าสู่ยาสูบ โดยใช้โปรโมเตอร์ CaMV35S พบว่า ส่วนกลีบดอกของยาสูบจะมีสีชมพูเข้มมากกว่าต้นควบคุม บางส่วนของดอกมีเม็ดสีที่ผิดปกติ เช่น ที่ filament จะมีสีชมพูเข้ม แสดงให้เห็นว่าการทำให้ยีน *DFR* จากแครนเบอร์รี่

เกิดการแสดงออกแบบ over expression ในยาสูบนั้นสามารถเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในพืช
แปลงพันธุ์ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและวิธีการ

3.1.1 พืชทดสอบ

- เมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุญชุกริก

3.1.2 เชื้อทดลอง

- เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105

3.1.3 พลาสมิดทดลอง

- pBI121DFR
- pCAMBIA2301DFR

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็ง และเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก ก ตารางที่ 1)

3.1.4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

- NAA (α -naphthalene acetic acid)
- TDZ [1- phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea]
- BA (benzyladenine)

3.1.4.3 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ

- 70% ethanol
- clorox (NaOHCl 5.25 %)
- Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan)

3.1.4.4 สารเคมีสำหรับเตรียมเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร YM (Yeast extract-Malt extract medium)

- Mannitol
- Yeast extract
- magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- di-potassium hydrogen orthophosphate 3-hydrate ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)
- sodium Chloride (NaCl)
- Bacto agar

3.1.4.5 สารเคมีสำหรับเตรียมเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร LB (Lulia-bertani agar)

- Tryptone
- Yeast extract
- sodium chloride (NaCl)
- agar

3.1.4.6 สารปฏิชีวนะ

- kanamycin
- cefotaxime

3.1.4.7 สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากบัวหลวง

- liquid Nitrogen
- tris-hydroxymethyl-methylamine (Tris base)
- ethylenediaminetetra acetic acid di-sodium salt, dehydrate (EDTA)
- sodiumchloride (NaCl)
- sodium dodecyl Sulfate (SDS)
- β - mercaptoethanol
- potassium Acetate (CH_3COOK)
- isopropanol or Absolute ethanol
- 70% ethanol
- steriled distilled water

3.1.4.8 สารเคมีสำหรับการทำพีซีอาร์

- 10x Taq buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 25mM MgCl_2
- dNTP (deoxy nucleotide triphosphate) mix
- primer

3.1.4.9 สารเคมีสำหรับเตรียมเจล

- agarose (SeaKem)
- 10X TBE buffer (Tris base, boric acid, disodium EDTA) หรือ 10X TAE buffer (Tris base, glacial acetic acid, EDTA)
- Gel loading buffer (6X gel loading, ethidium bromide)
- standard DNA 1 kb DNA ladder (Fermentas)

3.1.4.10 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ GUS

- buffer (NaPO_4 , potassium ferricyanide, potassium ferrocyanide, Na_2EDTA , H_2O)
- X-gluc substrate
- triton-X 100 (Tween 20)
- 70% ethanol

3.1.5 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.5.1 เครื่องหึ่งไฟฟ้าแบบละเอียด และแบบหยาบสำหรับหึ่งสารเคมี

3.1.5.2 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

3.1.5.3 ตู้ปลอดเชื้อหรือตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar flow) และอุปกรณ์

3.1.5.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

3.1.5.5 ตู้ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.5.6 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว ไม้แก้ว กรวย กระจกตวง ปีกเกอร์ ปิเปต งานแก้ว ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร ขวด Duran ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร แท่งแก้วคนสาร

3.1.5.7 ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) tip ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นป้ายระบุชื่อหน่วยงานการดำเนินงานไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.8 กล้องดิจิทัล และกล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

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

3.2 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

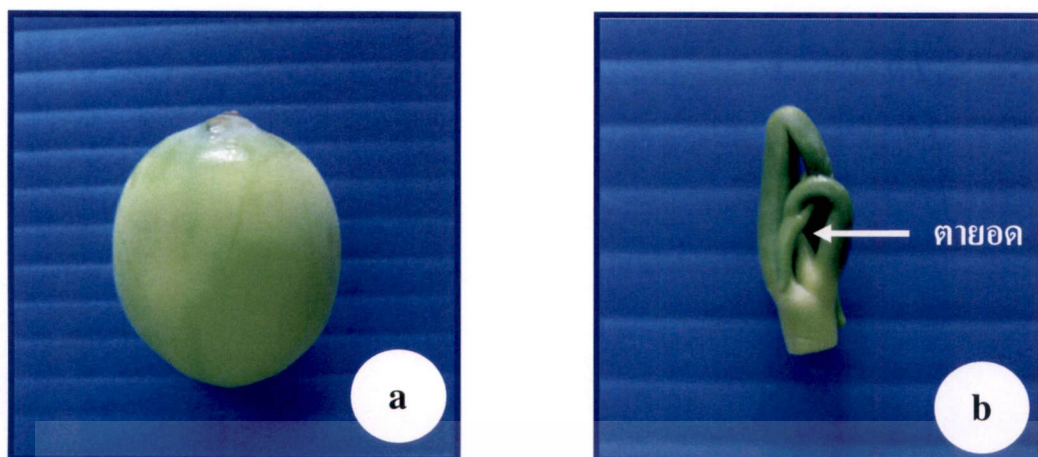
3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองระหว่าง พฤศจิกายน 2550 - ตุลาคม 2553

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมพืชทดลอง

นำเมล็ดบัวหลวงพันธุ์มณฑริก (ภาพที่ 3.1a) มาผ่านน้ำไหลนาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการฟอกเมล็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที จากนั้นฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (NaOCl 3 เปอร์เซ็นต์) 50 เปอร์เซ็นต์ และเติม Tween 20 จำนวน 2 หยด (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (ภักวดี ภักดีงาม, 2548) จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วนของคัพพะบริเวณตายอด (ภาพที่ 3.1b) เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภักวดี ภักดีงาม, 2548) เลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนก่อนนำมาถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณชกริก (a) และคัพพะ (b) ที่ต้องการ

3.4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.4.2.1 การเตรียมอาหารสูตรชักนำแคลลัส ตามวิธีการทดลองของ ภักวดี ภักดีงาม (2548)

เตรียมอาหาร MS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเติมน้ำตาล 30 กรัม ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5.5-5.7 ชั่งวุ้น (agar) 8 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารแข็ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำอาหารแข็งแต่ละสูตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเทใส่ในจานแก้ว (petri dish) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จานแก้วละประมาณ 25 - 30 มิลลิลิตร เมื่ออาหารในจานแก้วแข็งตัวแล้ว จึงเก็บใส่ถุงพลาสติก (ขั้นตอนดังกล่าวทำในตู้ย่ำเนื้อเยื่อ)

3.4.2.2 การเตรียมอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ตามวิธีการทดลองของ Shou *et al.* (2008)

เตรียมอาหาร MS (1962) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเติมน้ำตาล 30 กรัม ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5.5-5.7 ชั่งวุ้น 8 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารแข็ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำอาหารแข็งแต่ละสูตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเทใส่ในจานแก้ว ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จานแก้วละประมาณ 25 - 30 มิลลิลิตร เมื่ออาหารในจานแก้วแข็งตัวแล้ว จึงเก็บใส่ถุงพลาสติก (ขั้นตอนดังกล่าวทำในตู้ย่ำเนื้อเยื่อ) ส่วนการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซีโฟแทกซีม ในอาหารแข็งหรืออาหารเหลว หลังจากหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้ตั้งอาหารทิ้งไว้ให้เย็นลง อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมสารปฏิชีวนะดังกล่าวตามความเข้มข้นต่างๆลงไป

การทดลองที่ 1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยวางแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial experiment in CRD (completely randomized design) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 แสงสีที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

- แสงสีขาว (white light)
- แสงสีแดง (red light)

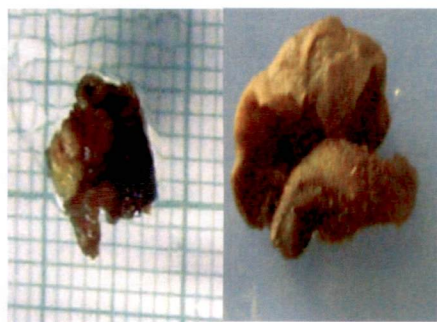
ปัจจัยที่ 2 ชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบ ได้แก่

- ดายอด
- ก้านใบ

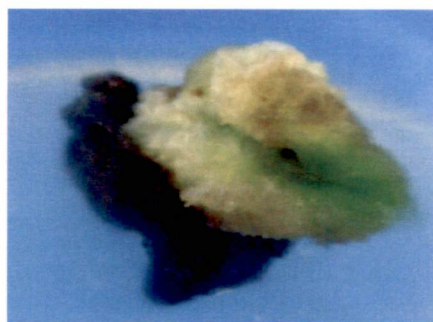
1. บันทึกการเจริญเติบโตแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์นุชทริก ด้วยการให้คะแนน โดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (ลำดับที่ 1 - 16) ดังนี้ (ภาพที่ 3.2 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์นุชทริก)

- คะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย (a)
- คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง ขาวหรือน้ำตาล แสดงอาการเริ่มตาย (b)
- คะแนน 3 ชิ้นส่วนคงสภาพเดิม มีสีเขียวอ่อน (c)
- คะแนน 4 ชิ้นส่วนที่มีแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่นสีเขียวเข้ม (d)
- คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีแคลลัสเกิดขึ้น และมีลักษณะที่เจริญเป็นยอด (e)

2. ขนาดของชิ้นส่วน



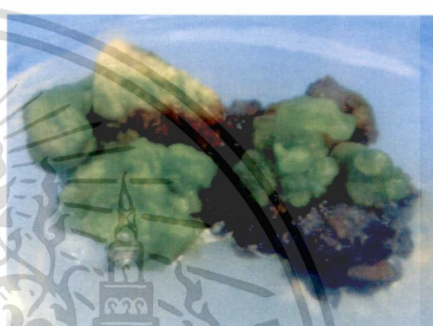
a.



b.



c.



d.



e.

ภาพที่ 3.2 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตแคลัสของบัวหลวงพันธุ์มณฑกริก (สัปดาห์ที่ 1-16)
(กำลังขยาย 0.17 เท่า)

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน

b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน

c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน

d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน

e แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 วิธีการ วิธีการละ 3 ซ้ำ คือ

วิธีการที่ 1 ไม่ใส่สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (control)

วิธีการที่ 2 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการที่ 3 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการที่ 4 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการที่ 5 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. บันทึกรการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายออกจากคัพเพาะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน) ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการให้คะแนน โดยแบ่งระดับคะแนนออกเป็น 5 ระดับ (สัปดาห์ที่ 1 - 8) ดังนี้ (ภาพที่ 3.3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายออกจากคัพเพาะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก)

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย (a)

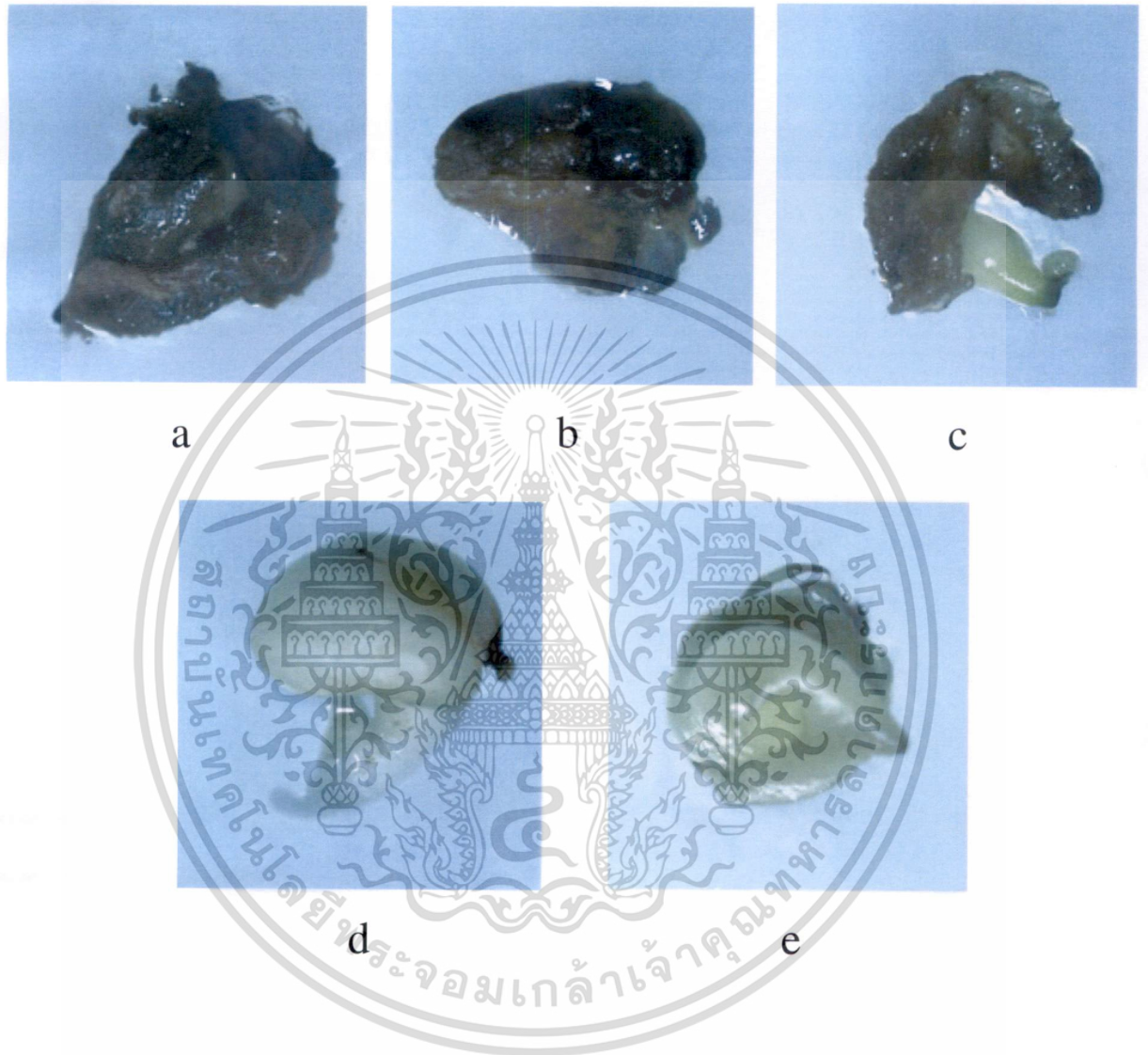
คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง และ สีน้ำตาล (c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนมีสีขาว (d)

คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีเขียวอ่อน (e)

2. ขนาดของชิ้นส่วน (ชิ้นส่วนเริ่มต้นมีขนาด 0.1 เซนติเมตร)



ภาพที่ 3.3 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตขึ้นส่วนตายออกจากรังของบั่วหลวงพันธุ์มัทริก

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน

b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน

c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน

d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน

e แสดงการให้คะแนน 5 คะแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การสร้างพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR

3.4.3.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α

โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Lulia-bertani agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อจาก 1 โคโลนี มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (starter) ด้วยเครื่องเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารขนาด 200 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ให้มีค่าประมาณ 0.3-0.4 จึงถ่ายเชื้อลงหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แห่หลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 0.1 M MgCl₂ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายอย่างเบามือ นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์อีกครั้ง ด้วยสารละลาย 0.1 M MgCl₂ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ใส่หลอดละ 1 มิลลิลิตร รวม 2 หลอดเข้าด้วยกัน เติมหีสเตรอล 100 เเปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แบ่ง competent cell ที่ได้ ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge) หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

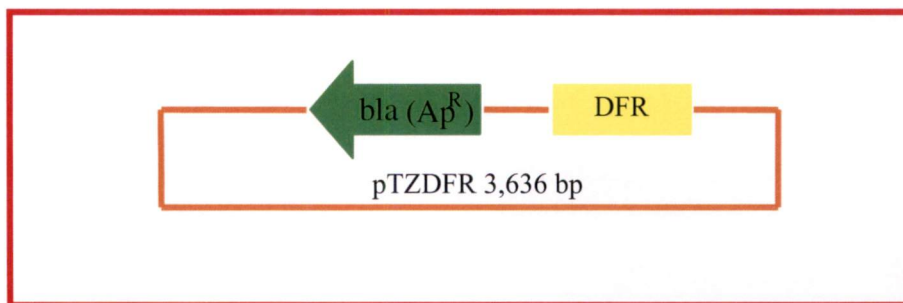
3.4.3.2 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI121DFR

นำพลาสมิด pTZDFR ขนาด 3,636 คู่เบส ภาพที่ 3.4 (โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สมบุญรณ์ อนันตลาโภชัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ซึ่งมียีน DFR ที่ได้จากดอกปทุมมาอยู่ นำพลาสมิด pTZDFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SacI และ BamHI (Fermentas[®]) เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน DFR ขนาดประมาณ 750 คู่เบสออกจากพลาสมิด นำยีนที่ได้โคลนเข้าพลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส (ภาพที่ 3.5) ในตำแหน่งแทนที่ยีน GUS ซึ่งถูกตัดแยกออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SacI และ BamHI เช่นเดียวกัน โดยในปฏิกริยามีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 10X tango buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ SacI และ BamHI ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3

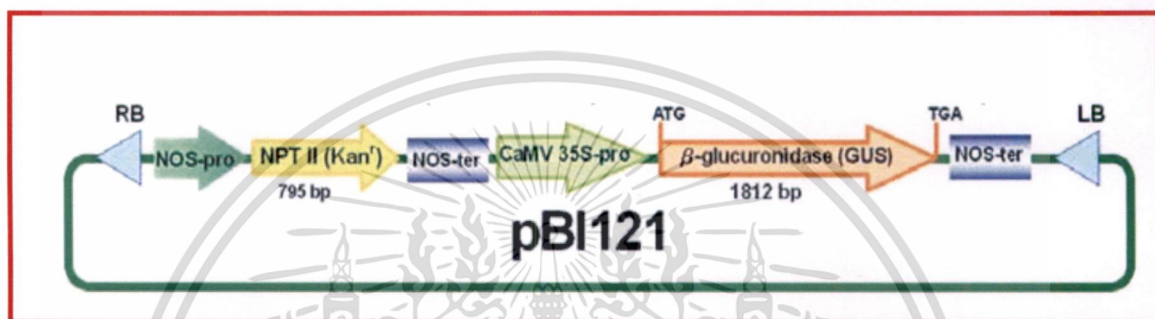
ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตโฟเรซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เเปอร์เซ็นต์ในการดำเนินการ
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นตัดชิ้นเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสของยีน *DFR* นำไปสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIA quick gel extraction kit (QIAGEN) โดยตัดเจลครอบแถบของผลการตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ *BamHI* ตามขนาดที่ต้องการ (ในทั้ง 2 พลาสมิดคือ pTZDFR และ pBI121) ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด จึงเติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นเปิดสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมนัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที จึงย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมนัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเชื่อมต่อ โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด (pBI121 *SacI/BamHI*) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Insert (pTZDFR *SacI/BamHI*) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10X Ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร T₄ DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไป transform โดยเลี้ยงบนอาหาร LB (streak) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และชักนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell (*E. coli* DH5 α) ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาละลายโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมพลาสมิด pBI121DFR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน competent cell ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง 850 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อละลายตะกอนเซลล์ นำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (อาหารคัดเลือก) โดยดูดเชื้อในปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.4 พลาสมิด pTZDFR



ภาพที่ 3.5 พลาสมิด pBI121

3.4.3.3 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม

สุ่มเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5 α ที่สามารถเติบโตบนอาหารคัดเลือก มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิด โดยใช้ FlavoPrepTM Plasmid DNA Extraction Mini Kit (FlavogenTM) โดยดูดอาหารเหลวที่มีเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนของอาหารด้านบนทิ้ง เติม FAPD1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นเติม FAPD2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อย่อยเซลล์ จากนั้นเติม FAPD3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบน ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ที่รองรับด้วย collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง เติม W1 buffer ลงใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเติม wash buffer ลงใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง แล้วจึงย้าย FAPD column ไปใส่หลอดไมโครเซนติพีวีจ์หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำพลาสติกหลอดผสมที่ได้มาตรวจสอบความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นทำการทดสอบการมีอยู่ของซิงไนด์ DFR ในพลาสติกหลอดผสม โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* นำไปตรวจสอบขนาดของซิงไนด์เอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตโฟเรซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

3.4.3.4 การสร้างพลาสติกสายผสม pCAMBIA2301DFR

นำพลาสติก pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* (Fermentas[®]) เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *DFR* ที่มีส่วนของ CaMV35S promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส ออกจากพลาสติก นำชิ้นส่วนของยีน *DFR* ที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสติก pCAMBIA2301 ขนาด 11,623 คู่เบส (ภาพที่ 3.6) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* เช่นเดียวกัน โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสติกหลอดผสม ปริมาตร 15 ไมโครลิตร 10X tango buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตโฟเรซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที (ทำตามข้อ 3.4.3.2 และ 3.4.3.3)

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน เติม 1 M Sorbitol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการใช้อุปกรณ์ดูดขึ้นลง แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.4.2 การนำพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR เข้าสู่โอรแบคทีเรีย

นำพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR มาอย่างละ 5 ไมโครลิตร (ทำงานบนน้ำแข็ง) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YM ใส่หลอดประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำ competent cell ของโอรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA 105 ที่วางบนน้ำแข็ง ให้ละลายแล้ว ทำการดูด competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลอดของพลาสมิดแต่ละตัว แล้วผสมกันอย่างเบามือ แช่บนน้ำแข็ง ทำการเซตเครื่อง โดยเลือกที่โหมด “Agr” จากนั้นดูดตัวอย่างขึ้นมาใส่หลอด electroporation cuvette แล้วนำไปใส่เครื่อง electroporation โดยปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวอย่าง นำตัวอย่างแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่เตรียมไว้ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูอาหารออกให้เหลือ 100 ไมโครลิตร เพื่อนำมาเกลี่ยที่ปริมาตร 10 25 และ 50 ไมโครลิตร ในอาหาร YM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวจากจานเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 เท่ากับ 0.6 - 0.7

3.4.5 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชทดลอง

ทำการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อโอรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA 105 เป็นพาหะ ที่มีพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR บรรจุอยู่ เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ภูษธริก ดังนี้

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายออกจากคัพเพาะเป็นเวลา 2 เดือนบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ แช่ในเชื้อโอรแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ โดยการเตรียมเชื้อ เริ่มจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 วัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 เท่ากับ 0.6 - 0.7 แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมอาหารเหลว MS 10 มิลลิลิตร และเติมสารอะซิโตไซลิง โคน เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นำแคลลัสมาแช่ในอาหารที่มีเชื้อดังกล่าว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติมอะซิโตไซลิง โคน เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ในสภาพมืด แล้วนำไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลล์สมาล้างออกด้วยอาหารเหลว MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ และเติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการใช้เป็นสารคัดเลือกลำดับแรกสำหรับเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน *NPTII* เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน โดยวางแผนการทดลองแบบ 2×2 Factorial in CRD วิธีการละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น ดังนี้

การทดลองที่ 3 การศึกษาการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 มีปัจจัยการทดลองดังนี้

ปัจจัย A ได้แก่ พลาสมิด 2 ชนิด

a_1 พลาสมิด pCAMBIA2301DFR

a_2 พลาสมิด pBI121DFR

ปัจจัย B ได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 ระดับ ดังนี้

b_1 ความเข้มข้นเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 1:10 แช่นาน 10 นาที

b_2 ความเข้มข้นเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 1:10 แช่นาน 30 นาที

3.4.6 การตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

3.4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี Gus histochemical assay โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GUS* มาแช่ในสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronide) ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ β -glucuronidase บ่มในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาตรวจสอบ GUS expression โดยดูจากการเกิดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วน

3.4.6.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *DFR* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

1. การสกัด genomic DNA จากพืช

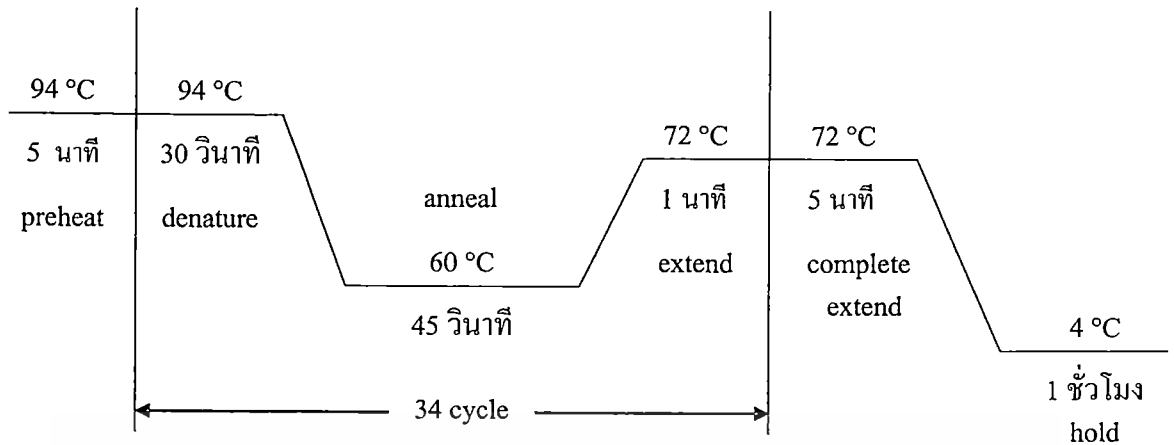
โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เริ่มจากการบดตัวอย่างในโกร่ง (ผ่านการฆ่าเชื้อ) ที่เย็นจัด (ใช้ในโตรเจนเหลวกับการบดตัวอย่าง) จากนั้นตัดตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่แช่ในโตรเจนเหลว แล้วเติม EB buffer 500 ไมโครลิตร (ก่อนเติมต้องนำ EB buffer ไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส) นำไปบ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเติม 5M K-Acetate 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา แช่น้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นไม่ต่ำกว่า 10 นาที ทุกครั้ง และต้องล้างหัวหลอดเปลี่ยนเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหยียงที่ 13,000 รอบ นาน 20 นาที คุณเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Absolute ethanol เท่ากับส่วนใสที่คุณคั้นมา แช่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นเหยียงที่ 10,000 รอบ นาน 2 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บส่วนของตะกอน เติมน้ำ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหยียงที่ 10,000 รอบ นาน 2 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บส่วนของตะกอน ทิ้งให้แห้ง เติมน้ำ 20 ไมโครลิตร นำมาตรวจด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUSA* และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรโมเตอร์ และเทอร์มินเตอร์ของยีน *DFR* ดังนี้

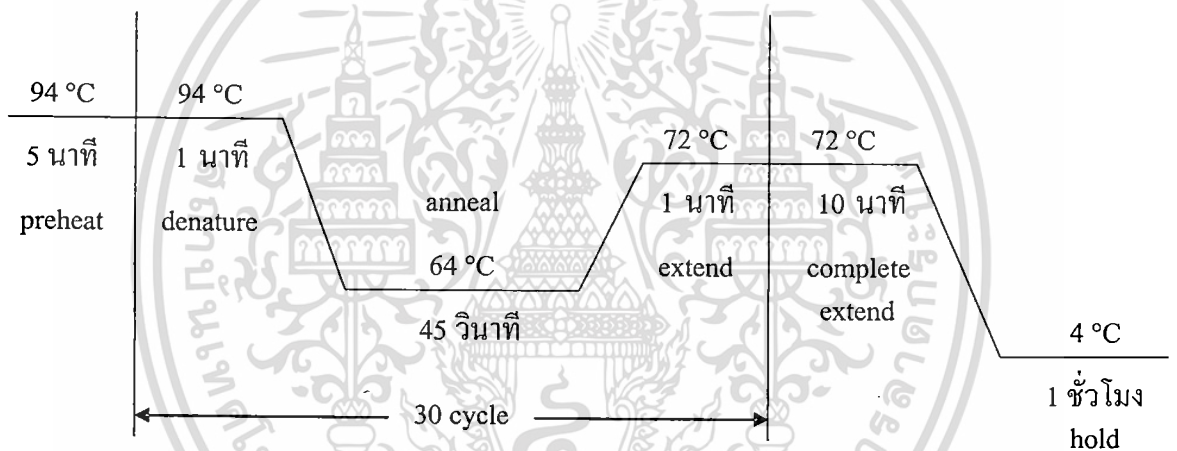
1. การเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100-300 นาโนกรัม, 2.5mM dNTPmix, 25mM MgCl₂, 10X *Taq* Buffer + (NH₄)₂SO₄, ชุดไพรเมอร์ (CaMV35s), (NOS) (ตารางที่ 3.1) และ 1 unit ของ *Taq* DNA polymerase (Fermentas) (สำหรับตรวจสอบยีน *DFR*) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ (T personal: Biometra) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ (preheat) จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ จำนวน 34 รอบ ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว (denature) จากนั้นลดอุณหภูมิลงที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับตัวอย่างเหมาะสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ (anneal) และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวอย่างเหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ (extend) เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 34 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้มีลำดับเบสที่สมบูรณ์ (complete extend) และเก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (hold) ถือเป็นขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่ที่เสร็จสมบูรณ์ (ภาพที่ 3.7) และปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับตรวจสอบยีน *NPTII* ใช้ชุดไพรเมอร์ *NPTII* และชุดไพรเมอร์ *GUSA* สำหรับตรวจสอบยีน *GUSA* (ตารางที่ 3.1) ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่ดังภาพที่ 3.8

หลังจากที่เครื่องพีซีอาร์ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตามที่กำหนด นำไปวิเคราะห์ผลผลิตด้วยพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพที่ 3.7 ขั้นตอนการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ สำหรับชุดไพรเมอร์ (CaMV35s), (NOS) จำนวน 34 รอบ



ภาพที่ 3.8 ขั้นตอนการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ สำหรับชุดไพรเมอร์ NPTII และ ชุดไพรเมอร์ GUS จำนวน 30 รอบ

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส
1. <i>DFR</i>	CaMV35s to NOS (F)	5'-AGGGATGACGCACAATCCCACT-3'
	CaMV35s to NOS (R)	5'-TCGCAAGACCGGCAACAGGA-3'
2. <i>NPTII</i>	NPTII (F)	5'-CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT-3'
	NPTII (R)	5'-ATCCATCATGGCTGATGCAATGCG-3'
3. <i>GUS</i>	GUSA (F)	5'-ATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGC-3'
	GUSA (R)	5'-ACGCGGTGATACATATCCAGCCAT-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ไว้สำหรับการใช้ของโรงเรียนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีการเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส

ชั่งอะกาโรสเจล 1 กรัม เติม 1X TBE buffer ให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ให้เจลละลายจนใส จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอจนเจลแข็งตัว ถอด comb ออก จากนั้นนำไปใส่ใน electrophoresis chamber

3. การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis

วางแผ่นเจลลงบน electrophoresis chamber เท 1X TBE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นผสม gel loading buffer 2 ไมโครลิตร กับผลิตภัณฑ์สีอาร์ 10 ไมโครลิตร บนแผ่นพาราฟิน ดูดสารทั้งหมดใส่ลงในหลุม เจลตามที่ได้กำหนดไว้ โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder (Fermentas) ขนาด 1 kb เป็นแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องถ่ายภาพเจล (SynGene, UK)

3.5 การบันทึกผล

3.5.1 บันทึกผลลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน ได้แก่ การดูลักษณะแคลลัส โดยการวัดขนาดแคลลัส และ จำนวนการเกิดยอด

3.5.2 บันทึกผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS*

ให้คะแนนการเกิดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนของบัวที่ผ่านการถ่ายโอนยีน เมื่อทดสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay

3.5.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *DFR* ด้วยวิธีพีซีอาร์

หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้ว (standard size marker)

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยใช้ตาราง Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้น และแสงที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ภายใต้ปัจจัยแสงสี ระหว่างแสง cool white fluorescent และ red light โดยนำชิ้นส่วนตาชอดจาก คัพพะ และก้านใบจากคัพพะ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนต่างๆของบัวหลวงพันธุ์บุษราคัมมีดังนี้

การเจริญเติบโตแคลลัส ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

จากการศึกษาการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตาชอด และก้านใบจากคัพพะ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยนำชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า ทุกๆสัปดาห์คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) และพบว่า ชิ้นส่วนจากคัพพะ ทั้ง 2 ชนิด สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาชอดจากคัพพะ และก้านใบจากคัพพะ มีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น มีสีเขียว (ภาพที่ 3.2) โดยค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีค่าสูงที่สุด เมื่อใช้ชิ้นส่วนตาชอดจากคัพพะ คือ 3.80 คะแนน และชิ้นส่วนตาชอดจากคัพพะนี้ยังพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้นได้ (ภาพที่ 3.2, e) ภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาพแสงสีขาว (white light) และเมื่อเลี้ยงในสภาพแสงสีแดง (red light) ชิ้นส่วนก้านใบจะมีแนวโน้มของคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่เจริญดีกว่าในส่วนของตาชอด

ส่วนขนาดการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.2) โดยเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยขนาดของแคลลัสของชิ้นส่วนทั้งสอง พบว่า ในทุกๆสัปดาห์ ขนาดของแคลลัสจะเพิ่มขึ้น และขนาดชิ้นส่วนก้านใบจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าชิ้นส่วนตาชอด

ตารางที่ 4.1 คะแนนการเจริญเติบโตแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากคัพภะ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

แสง	ชิ้นส่วน	การเจริญเติบโตแคลลัส (คะแนน)(±SE) ¹⁾							
		อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
แสงสีขาว (White light)	ตายอด	3.00±0.00	2.86±0.13	2.73±0.17	2.60±0.23	2.86±0.26	3.40±0.34	3.40±0.30	3.80±0.23
	ก้านใบ	3.00±0.11	3.00±0.00	2.80±3.14	2.60±0.00	2.66±0.13	3.15±0.18	3.20±0.20	3.20±0.20
แสงสีแดง (red light)	ตายอด	2.86±0.13	2.86±0.13	2.86±0.13	2.80±0.20	2.41±0.41	2.25±0.52	2.00±0.50	1.58±0.36
	ก้านใบ	3.00±0.11	2.93±0.06	2.73±0.13	3.00±0.00	2.93±0.06	2.93±0.48	3.13±0.59	2.93±0.46
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		6.15	5.93	8.03	9.62	16.44	23.88	25.30	20.02

¹⁾ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.2 ขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตาขอด และก้านใบจากคัพพะ บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

แสง	ชิ้นส่วน	ขนาดของแคลลัส (ตารางเซนติเมตร)(±SE) ^{1/}							
		อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
แสงสีขาว (White light)	ตาขอด	0.20±0.01	0.36±0.02	0.49±0.03	0.55±0.06	0.81±0.09	1.06±0.12	1.42±0.17	1.84±0.23
	ก้านใบ	0.26±0.01	0.50±0.00	0.69±0.01	0.70±0.08	1.11±0.11	1.70±0.18	2.04±0.19	2.34±0.21
แสงสีแดง (red light)	ตาขอด	0.33±0.10	0.37±0.05	0.52±0.08	0.80±0.15	0.79±0.17	1.00±0.27	1.05±0.17	0.82±0.16
	ก้านใบ	0.32±0.03	0.54±0.03	0.72±0.06	0.85±0.05	1.10±0.15	1.32±0.16	1.30±0.30	1.61±0.36
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		33.34	12.94	16.19	23.34	25.22	26.63	25.96	26.81

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ใช้เป็นสารคัดเลือก

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน เป็นสารคัดเลือก สำหรับเนื้อเยื่อที่ได้รับ การถ่ายยีน *NPTII* โดยเฉพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่ดัดแปลงโดยเติม สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 0 50 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

เปอร์เซ็นต์การตาย และขนาดของชิ้นส่วนตายอดจากคัพเพาะ บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ใช้เป็นสารคัดเลือก ในชิ้นส่วน ตายอดจากคัพเพาะ พบว่า ในอาหารคัดเลือกทุกวิธีการ จะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ จากตารางที่ 4.3 ในสัปดาห์ที่ 1 ชิ้นส่วนตายอด ในอาหารคัดเลือกมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ ชิ้นส่วน ยังมีสีเขียวอ่อน โดยมีคะแนนการเจริญเติบโต ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายคือ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ใน สัปดาห์ที่ 2 และ 3 ชิ้นส่วนตายอด ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (control) ลักษณะชิ้นส่วนยังมีสีเขียว แต่ในอาหารคัดเลือกที่ความเข้มข้นต่างๆ ชิ้นส่วนมีลักษณะที่เริ่มเปลี่ยน จากสีเขียวเป็นสีเหลือง ในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป ในสัปดาห์ที่ 4 ถึง 6 ชิ้นส่วนตายอดที่เลี้ยงใน อาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (control) มีลักษณะชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และในอาหารคัดเลือกความเข้มข้นอื่นๆ มีลักษณะชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว จนกระทั่ง ในสัปดาห์ที่ 8 ถึง 10 และในสัปดาห์ที่ 8 ถึง 10 นี้ พบว่า มีเพียงระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ ลิตรของกานามัยซิน ที่เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลปน ทุกชิ้นส่วน และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายในสัปดาห์ที่ 10 เป็น 93.00 เปอร์เซ็นต์ และทุกสัปดาห์ที่กล่าวมาไม่มีการเกิดเป็นแคลลัส เมื่อพิจารณาจากสีของชิ้นส่วนที่ เปลี่ยนไป ดังภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ชัดกว่า โดยชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะกานามัย ซินมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และขนาดของ ชิ้นส่วนมีขนาดที่เพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ จากตารางที่ 4.4 ในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 2 พบว่าชิ้นส่วนตายอดที่ เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และชิ้นส่วนตายอดที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสาร ปฏิชีวนะกานามัยซิน จะมีขนาดของชิ้นส่วนที่ไม่ต่างกันนัก โดยขนาดของชิ้นส่วนจะเริ่มมีความ แตกต่างกันมากขึ้น ตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป จนถึงในสัปดาห์ที่ 8 ของทุกความเข้มข้นของ สารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ กานามัยซิน (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน/อายุ (สัปดาห์) (\pm SE) ^{1/}									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
control	0.00 \pm 0.00a	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00c	17.80 \pm 2.22c	22.27 \pm 2.26c	23.33 \pm 8.82b	24.47 \pm 15.58b	28.47 \pm 15.22b	29.00 \pm 15.32c	30.83 \pm 16.23c
50	0.00 \pm 0.00a	17.80 \pm 2.20	27.80 \pm 6.18b	50.06 \pm 1.90a	54.47 \pm 2.93a	54.47 \pm 2.93a	61.13 \pm 1.13a	72.27 \pm 4.82a	83.33 \pm 4.41a	93.00 \pm 2.84a
100	0.00 \pm 0.00a	23.33 \pm 8.82	37.80 \pm 2.20ab	47.80 \pm 4.02ab	51.13 \pm 5.89ab	52.27 \pm 1.13a	54.47 \pm 2.93a	54.47 \pm 2.93ab	63.33 \pm 3.33ab	74.17 \pm 4.92ab
200	0.00 \pm 0.00a	22.26 \pm 2.26	35.60 \pm 2.20ab	41.13 \pm 1.13b	41.13 \pm 1.13b	42.27 \pm 3.97a	44.47 \pm 4.46ab	45.60 \pm 4.02ab	53.33 \pm 4.41bc	65.37 \pm 5.64b
300	0.00 \pm 0.00a	17.80 \pm 11.76	40.00 \pm 0.00a	41.20 \pm 2.94b	41.80 \pm 2.99b	42.26 \pm 4.82a	42.27 \pm 2.26ab	43.20 \pm 1.97bc	48.93 \pm 5.87bc	61.10 \pm 4.62b
F-test	-	ns	**	**	**	**	*	*	**	**
CV%	0.00	51.76	18.97	11.50	14.06	20.31	28.45	26.72	24.88	22.28

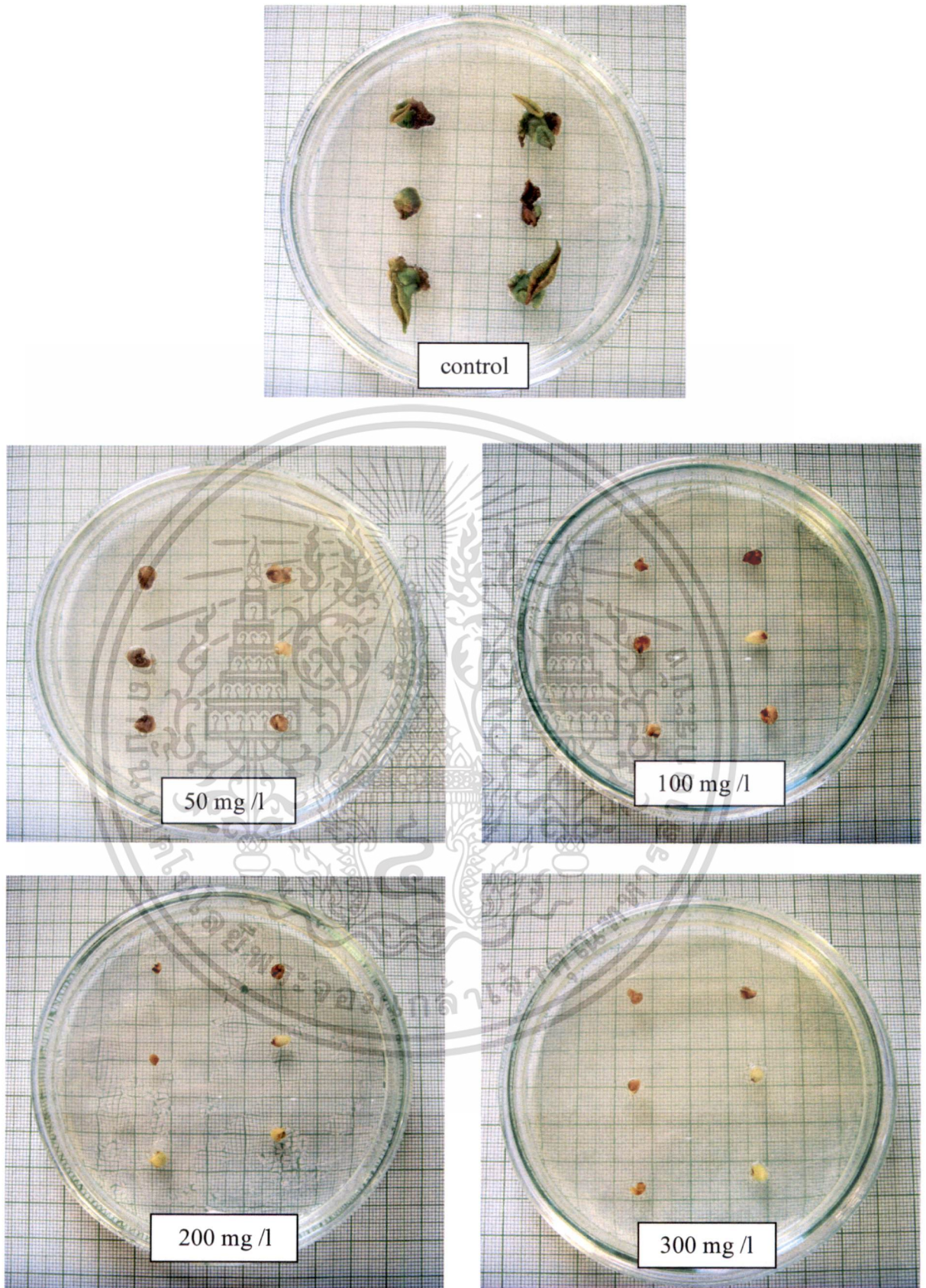
^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
 ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 99%

ตารางที่ 4.4 ผลของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากฝัก ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS

ความเข้มข้นของ kanamycin (mg/l)	ขนาดตายออกจากฝัก (ตารางเซนติเมตร)/อายุ (สัปดาห์) ^{1/} (±SE) ^{1/}							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.21±0.00b	0.21±0.00b	0.62±0.07a	1.03±0.13a	1.11±0.14a	1.20±0.14a	1.32±0.14a	1.53±0.14a
50	0.21±0.00b	0.21±0.00b	0.32±0.00b	0.39±0.00b	0.51±0.04b	0.59±0.00b	0.59±0.00b	0.58±0.00b
100	0.32±0.00a	0.32±0.00a	0.39±0.00b	0.45±0.02b	0.40±0.00b	0.38±0.01b	0.38±0.01b	0.36±0.01b
200	0.34±0.01a	0.34±0.01a	0.38±0.01b	0.38±0.01b	0.47±0.02b	0.48±0.02b	0.48±0.02b	0.47±0.03b
300	0.34±0.01a	0.34±0.01a	0.37±0.01b	0.39±0.02b	0.41±0.04b	0.52±0.07b	0.48±0.06b	0.43±0.08b
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**
CV%	7.13	7.13	13.61	21.05	21.12	20.43	19.04	19.62

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 99%



ภาพที่ 4.1 แสดงการทดสอบสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อชิ้นส่วนตายอดจากลักษณะของบัวหลวง

พันธุ์บูรณทริก (สัปดาห์ที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการสร้างพลาสมิด pBI121DFR และ pCAMBIA2301DFR

4.2.1 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI121DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI*

พลาสมิด pBI121DFR ที่มีขนาด 13,696 คู่เบส ได้จากการตัดชิ้น *DFR* ที่อยู่ในพลาสมิด pTZDFR มาต่อเข้าพลาสมิด pBI121 ตามวิธีในข้อ 3.4.3.2 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* ดังภาพที่ 4.2 จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น คือ ขนาด 2,886 คู่เบส และขนาดประมาณ 750 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน *DFR* (ช่องที่ 3-5) ในพลาสมิด pTZDFR และในช่องที่ 7-9 เป็นการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* เช่นเดียวกัน ในพลาสมิด pBI121 จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น คือ ขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส และอีก 1 ชั้นจะแยกเอาส่วนของยีน *GUS* ขนาด 1,812 คู่เบสออกจากพลาสมิด pBI121 เพื่อรอการเชื่อมต่อตรงตำแหน่งที่ถูกตัดออก โดยตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pBI121DFR โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit

พลาสมิดสายผสม pBI121DFR ที่สกัดได้นี้ประกอบด้วยส่วนของยีน *DFR* ขนาด 750 คู่เบส ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มินเตอร์ NOS และยีนคัดเลือก *NPTII* ขนาด 254 คู่เบส ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS และเทอร์มินเตอร์ NOS มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเชื่อมต่อ โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* อีกครั้ง ได้ผลดังภาพที่ 4.3 ในช่องที่ 3 และ 4 จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้นคือ ขนาด 750 คู่เบส และ ขนาด 11,633 คู่เบส แสดงว่าในพลาสมิด pBI121DFR มีขนาดยีน *DFR* เท่ากับที่อยู่ในพลาสมิด pTZDFR ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ โดยโครงสร้างของพลาสมิด pBI121DFR เป็นดังภาพที่ 4.6 และในช่องที่ 5 พบแถบดีเอ็นเอ 4 ชั้นคือ ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ขนาดประมาณ 800 คู่เบส ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และขนาด 9,633 คู่เบส

4.2.3 การสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII*

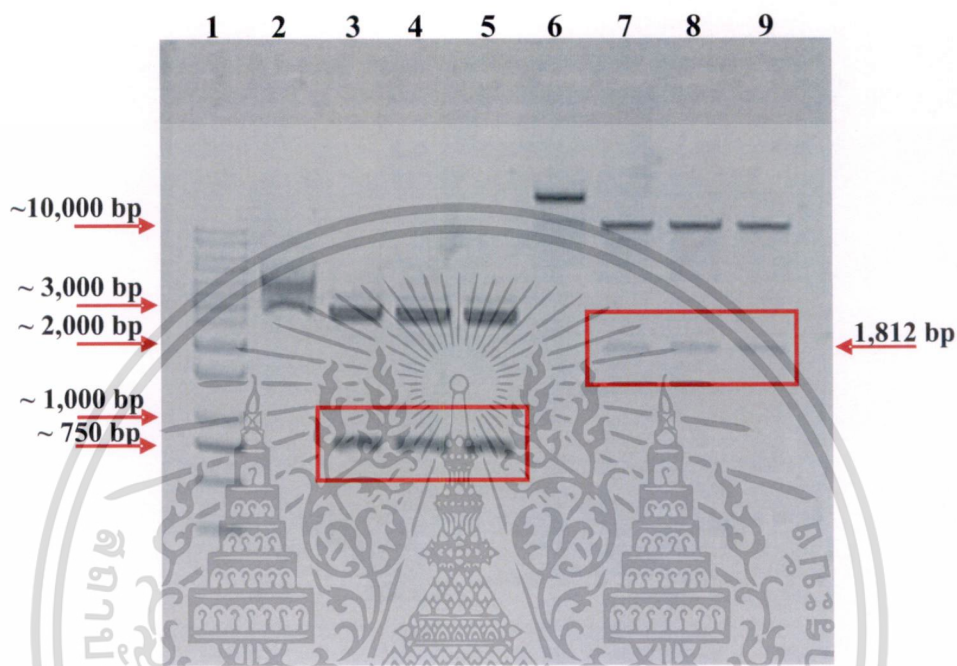
พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ที่มีขนาด 12,383 คู่เบส ได้จากการตัดตั้งแต่ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ CaMV35S จนถึงเทอร์มินเตอร์ NOS ที่มียีน *DFR* อยู่ จากพลาสมิด pBI121DFR มาต่อเข้าพลาสมิด pCAMBIA2301 ตามวิธีในข้อ 3.4.3.4 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ดังภาพที่ 4.4 ในพลาสมิด pCAMBIA2301 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส และชั้นที่เป็นตำแหน่งของ multiple cloning site ซึ่งมีขนาด

เอ็ดดิ้งกรรณิ์ดักั ทังลัน อักทังห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เล็กมากจนหลุดออกไป (ช่องที่ 2) และในพลาสมิด pBI121DFR จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น คือ ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส (ช่องที่ 3) จากการตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

4.2.4 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit

พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR ที่สกัดได้นี้ประกอบด้วยส่วนของยีน *GUS* ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และยีน *DFR* ขนาด 750 คู่เบส ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มินเตอร์ NOS และยีนคัดเลือก *NPTII* ขนาด 254 คู่เบส ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS และเทอร์มินเตอร์ PolyA มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเชื่อมต่อ โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* อีกครั้ง ได้ผลดังภาพที่ 4.5 พบว่ามีเพียงช่องที่ 4 และ 7 ที่พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้นคือ ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส แสดงว่าในพลาสมิด pCAMBIA2301DFR ได้รับยีนที่ตรงกับพลาสมิด pBI121DFR ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ โดยโครงสร้างของพลาสมิด pCAMBIA2301DFR เป็นดังภาพที่ 4.7 โดยมีตั้งแต่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มินเตอร์ NOS ที่มียีน *DFR* อยู่ตรงกลาง



ภาพที่ 4.2 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder

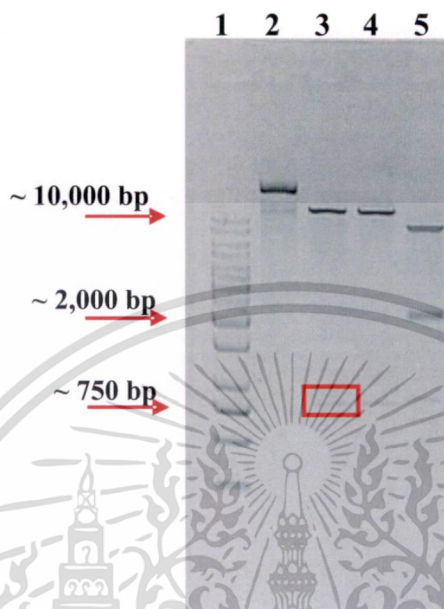
ช่องที่ 2 พลาสมิด pTZDFR

ช่องที่ 3, 4, 5 พลาสมิด pTZDFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 และ 2,886 คู่เบส

ช่องที่ 6 พลาสมิด pBI121

ช่องที่ 7, 8, 9 พลาสมิด pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,812 และขนาด 10,000 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การตรวจสอบพลาสมิด pBI121DFR หลังจากการเชื่อมต่อดำเนินการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI *Sac*I *Xba*I และ *Nco*I

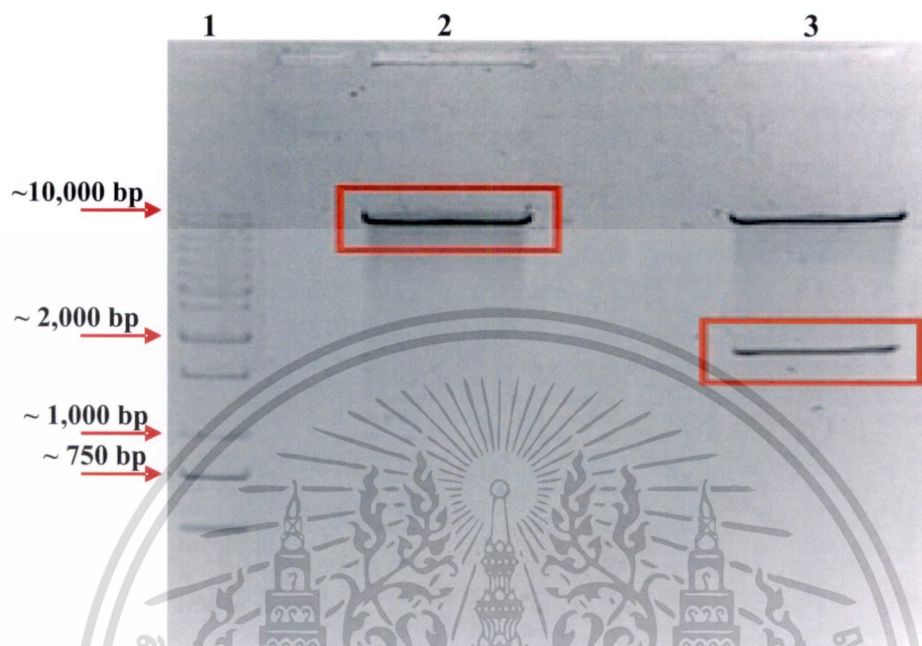
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1-kb DNA ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pBI121DFR

ช่องที่ 3 พลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Bam*HI ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 คู่เบส และ ขนาด 11,633 คู่เบส

ช่องที่ 4 พลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 คู่เบสและ ขนาด 11,633 คู่เบส

ช่องที่ 5 พลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ขนาดประมาณ 800 คู่เบส ขนาด 2,000 คู่เบส และขนาด 9,633 คู่เบส



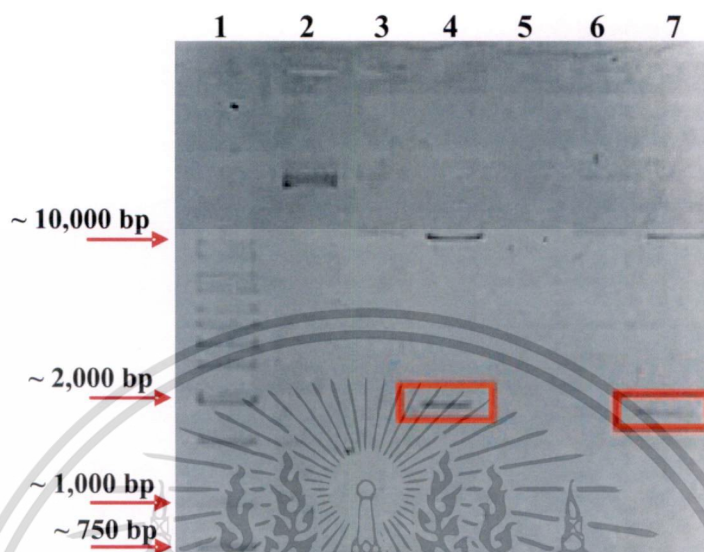
ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบพลาสมิด pCAMBIA2301 และ pBI121DFR ด้วยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII*

ช่องที่ 1 คือเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิด pCAMBIA2301 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด ประมาณ 10,000 คู่เบส

ช่องที่ 3 พลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และ ขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การตรวจสอบพลาสมิด pCAMBIA2301DFR หลังจากการเชื่อมต่อดำเนินการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII*

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder

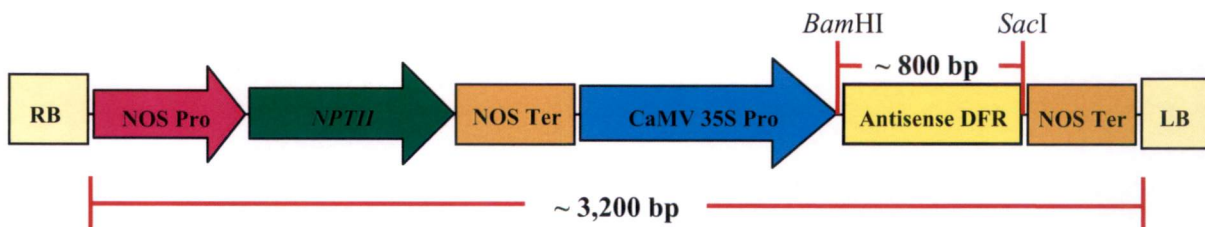
ช่องที่ 2 พลาสมิด pCAMBIA2301DFR

ช่องที่ 3 และ 6 พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบ ดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส

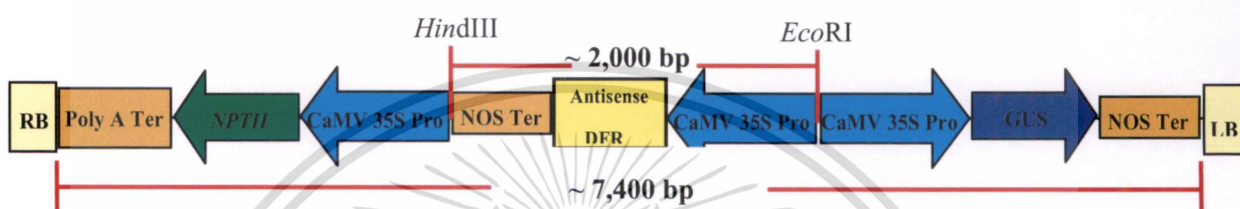
ช่องที่ 5 พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

ช่องที่ 4 และ 7 พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบ ดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 โครงสร้างพลาสมิด pBI121DFR



ภาพที่ 4.7 โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

การทดลองที่ 3 การศึกษาการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105

การเจริญเติบโตของแคลลัส ขนาดของแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 4.44 ไมโครโมลาร์

จากการศึกษาการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 โดยมีพลาสมิดทดสอบ 2 ชนิด คือ พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR ทดสอบร่วมกับความเข้มข้นของเชื้อโกรแบคทีเรียและระยะเวลา 2 ระดับ คือ 1:10 แชนาน 10 นาที 1:10 แชนาน 30 นาที หลังจากการถ่ายยีนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 2 เดือน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ จากตารางที่ 4.5 ชิ้นส่วนมีขนาดเพิ่มขึ้นในทุกๆ สัปดาห์หลังจากการถ่ายยีนด้วยพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด คือ พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR เมื่อพิจารณาในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า จากการทดลองพลาสมิดทั้ง 2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 99 % โดยแคลลัสมีขนาด 0.95 และ 1.09 ตารางเซนติเมตรตามลำดับ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเชื้อโกรแบคทีเรียร่วมกับระยะเวลาที่ดีที่สุดคือ 1:10 แชนาน 10 นาที เมื่อพิจารณาขนาดของแคลลัสโดยพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับความเข้มข้นของเชื้อและระยะเวลา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือขนาดของ แคลลัสจะมีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาในสัปดาห์ที่ 16 พบว่า พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ที่ระยะเวลา 1:10 แชนนาน 10 นาที แคลลัสจะมีขนาดที่ใหญ่กว่าที่ระยะเวลา 1:10 แชนนาน 30 นาที คือมีขนาด 1.09 ตารางเซนติเมตร ส่วนในพลาสมิด pBI121DFR ที่ระยะเวลาทั้ง 2 ไม่มีความแตกต่างกันของขนาดคือ มีขนาด 1.20 ตารางเซนติเมตร โดยขนาดของแคลลัส อาจมีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย เนื่องจากแคลลัสที่ทดลองอาจมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือแคลลัสที่ใช้ในการทดลองตาย จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้มีการลดลงหรือเพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส หลังจากการถ่ายยีน บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์

หลังจากการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 โดยมีพลาสมิดทดสอบ 2 ชนิดคือ พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR จากตารางที่ 4.6 เมื่อพิจารณาในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า พลาสมิดทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ทดลอง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 % โดยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR ในสัปดาห์ที่ 2-4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากันที่ 99.33 เปอร์เซ็นต์ และพลาสมิด pBI121DFR ในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 95.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลา พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 ที่ความเข้มข้นและระยะเวลา คือ 1:10 แชนนาน 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 99.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาระหว่างพลาสมิดร่วมกับความเข้มข้นและระยะเวลา พบว่า พลาสมิดทั้ง 2 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดีที่สุดที่ 1:10 แชนนาน 10 นาที โดยในสัปดาห์สุดท้ายจะเห็นว่า พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 9.33 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาคือ 1:10 แชนนาน 10 นาที และในสัปดาห์ที่ 6 ถึง 16 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การตรวจสอบต้นบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีน หลังจากการถ่ายยีน ด้วยวิธี Gus histochemical assay

หลังจากการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 โดยมีพลาสมิดทดสอบ 2 ชนิด คือ พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี Gus histochemical assay โดยการให้คะแนนการติดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วน (ภาพที่ 4.8) จากตารางที่ 4.7 ชิ้นส่วนที่ใช้ในการทดสอบคือ ก้านใบ และใบ พบว่า เมื่อพิจารณาจาก 2 พลาสมิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 99% โดยในพลาสมิด pCAMBIA2301DFR มีการติดสีน้ำเงินที่ 49.59

เปอร์เซ็นต์ และในพลาสมิด pBI121DFR มีการติดสีน้ำเงินที่ 20.00 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นการถ่ายยีนไม่ต่างกันทุกชิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับระยะเวลาในการทดลองที่ดีที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนติดสีน้ำเงิน คือ 1:10 ใช้นาน 30 นาที มีการติดสีน้ำเงิน 35.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพลาสมิด 2 ชนิด ร่วมกับความเข้มข้นของเชื้อและระยะเวลาการบ่มเชื้อ จะเห็นว่า การถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR ชิ้นส่วนติดสีน้ำเงินดีที่สุด คือ 51.19 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการบ่มเชื้อ 1:10 ใช้นาน 30 นาที และการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR ชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างด้านความเข้มข้นของเชื้อและระยะเวลาการบ่มเชื้อ คือชิ้นส่วนติดสีน้ำเงินเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.8 การให้คะแนนการติดสีน้ำเงินจากการตรวจสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ขนาดของแคลลัสหลังการถ่ายยีน บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์

การทดลอง		ขนาดการเจริญเติบโตของแคลลัสหลังการถ่ายยีน (ตารางเซนติเมตร) (+SE) ^{1/}									
		อายุ (สัปดาห์)									
		2	4	6	8	10	12	14	16		
plasmid	pCAMBIA2301DFR	0.68±0.02	0.80±0.01	0.95±0.01b	0.99±0.02	1.19±0.04	0.80±0.22	0.93±0.25	0.94±0.31		
	pBI121DFR	0.74±0.03	0.83±0.03	1.09±0.02a	1.08±0.02	1.28±0.03	0.93±0.25	1.06±0.28	1.20±0.32		
F-test		ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns		
ระยะเวลา	1:10 10 นาที	0.69±0.03	0.80±0.02	1.01±0.03	1.03±0.02	1.18±0.04	0.81±0.22	0.95±0.26	1.14±0.31		
	1:10 30 นาที	0.73±0.02	0.83±0.02	1.03±0.03	1.04±0.03	1.29±0.03	0.93±0.25	1.04±0.28	1.00±0.33		
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
plasmid	pCAMBIA2301DFR	ระยะเวลา	1:10 10 นาที	0.66±0.04	0.80±0.02	0.95±0.02	0.99±0.04	1.16±0.08	0.75±0.31	0.87±0.36	1.09±0.45
			1:10 30 นาที	0.71±0.02	0.80±0.01	0.96±0.01	1.00±0.04	1.23±0.04	0.86±0.35	0.99±0.40	0.80±0.49
	pBI121DFR	ระยะเวลา	1:10 10 นาที	0.71±0.05	0.81±0.05	1.08±0.04	1.08±0.03	1.21±0.03	0.87±0.35	1.03±0.42	1.20±0.49
			1:10 30 นาที	0.76±0.04	0.85±0.04	1.11±0.04	1.09±0.04	1.35±0.05	0.99±0.40	1.08±0.44	1.20±0.48
F-test			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
CV (%)			13.56	11.64	7.81	9.31	11.02	34.14	36.34	40.47	

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 99%

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสหลังจากการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์

การทดลอง		เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสหลังการถ่ายยีน (\pm SE) ¹⁾									
		อายุ (สัปดาห์)									
		2	4	6	8	10	12	14	16		
plasmid	pCAMBIA2301DFR	99.33 \pm 0.66a	99.33 \pm 0.66a	91.99 \pm 2.59	65.99 \pm 3.21	43.99 \pm 5.46	18.66 \pm 5.69	11.99 \pm 3.55	7.33 \pm 2.71		
	pBI121DFR	94.66 \pm 1.66b	95.33 \pm 1.73b	93.33 \pm 2.43	61.99 \pm 3.85	38.66 \pm 3.26	19.99 \pm 5.88	14.66 \pm 4.53	7.99 \pm 2.94		
F-test		*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
ระยะเวลา	1:10 10 นาที	98.66 \pm 0.88	99.33 \pm 0.66a	92.66 \pm 2.31	66.66 \pm 4.09	42.66 \pm 4.57	19.33 \pm 5.66	13.33 \pm 4.09	9.33 \pm 3.01		
	1:10 30 นาที	95.33 \pm 1.73	95.33 \pm 1.73b	92.66 \pm 2.71	61.33 \pm 2.77	39.99 \pm 4.55	19.33 \pm 5.92	13.33 \pm 4.09	5.99 \pm 2.52		
f-test		ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
plasmid	pCAMBIA2301DFR	ระยะเวลา	1:10 10 นาที	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	87.99 \pm 2.49	70.66 \pm 5.42	43.99 \pm 8.60	19.99 \pm 9.21	11.99 \pm 5.34	9.33 \pm 4.00
			1:10 30 นาที	98.66 \pm 1.33	98.66 \pm 1.33	96.00 \pm 4.00	61.33 \pm 2.49	43.99 \pm 7.79	17.33 \pm 7.79	11.99 \pm 5.34	5.33 \pm 3.89
	pBI121DFR	ระยะเวลา	1:10 10 นาที	97.33 \pm 1.63	98.66 \pm 1.33	97.33 \pm 2.67	62.66 \pm 6.19	41.33 \pm 4.43	18.66 \pm 7.73	14.66 \pm 6.81	9.33 \pm 5.00
			1:10 30 นาที	91.99 \pm 2.50	91.99 \pm 2.50	89.33 \pm 3.40	61.33 \pm 5.34	35.99 \pm 5.00	21.33 \pm 9.77	14.66 \pm 6.81	6.66 \pm 3.65
F-test				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
C.V. (%)				3.76	3.59	7.71	17.66	36.15	22.25	16.81	21.86

¹⁾ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95%

ตารางที่ 4.7 การให้คะแนนการติดสีน้ำเงินจากการทดสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay

การทดลอง		คะแนนการติดสีน้ำเงินจากการทดสอบ ด้วยวิธี Gus histochemical assay (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์) (+SE) ^{1/}	
Plasmid	pCAMBIA2301DFR	49.59±2.19a	
	pBI121DFR	20.00±0.00b	
F-test		**	
ระยะเวลา	1:10 10 นาที	34.00±5.00	
	1:10 30 นาที	35.59±5.32	
F-test		ns	
plasmid	pCAMBIA2301DFR	1:10 10 นาที	48.00±3.82
		1:10 30 นาที	51.19±2.41
	pBI121DFR	1:10 10 นาที	20.00±0.00
		1:10 30 นาที	20.00±0.00
F-test		ns	
CV (%)		18.53	

"ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

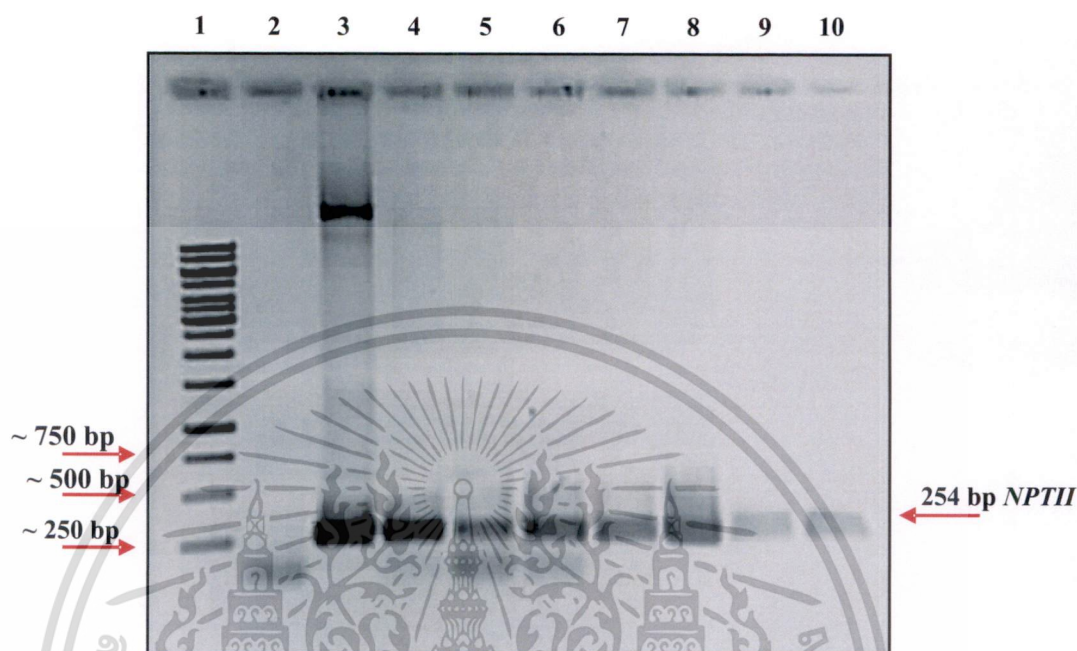
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 99%

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *DFR* หลังจากการถ่ายยีน ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

หลังจากการถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 โดยมีพลาสมิดทดสอบ 2 ชนิด คือ พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR โดยผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะกานามัยซินแล้ว นำต้นบัวหลวงที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือก และต้นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *DFR* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายละเอียดในข้อ 3.4.6.2 (1) โดยใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาดังภาพที่ 3.7 และ ภาพที่ 3.8 จากนั้นนำ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีสิส ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน

เอกรังสีอินฟราเรด (FTIR) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเปรียบเทียบค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NPTII ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และ พลาสมิด pBI121DFR (ภาพที่ 4.9)

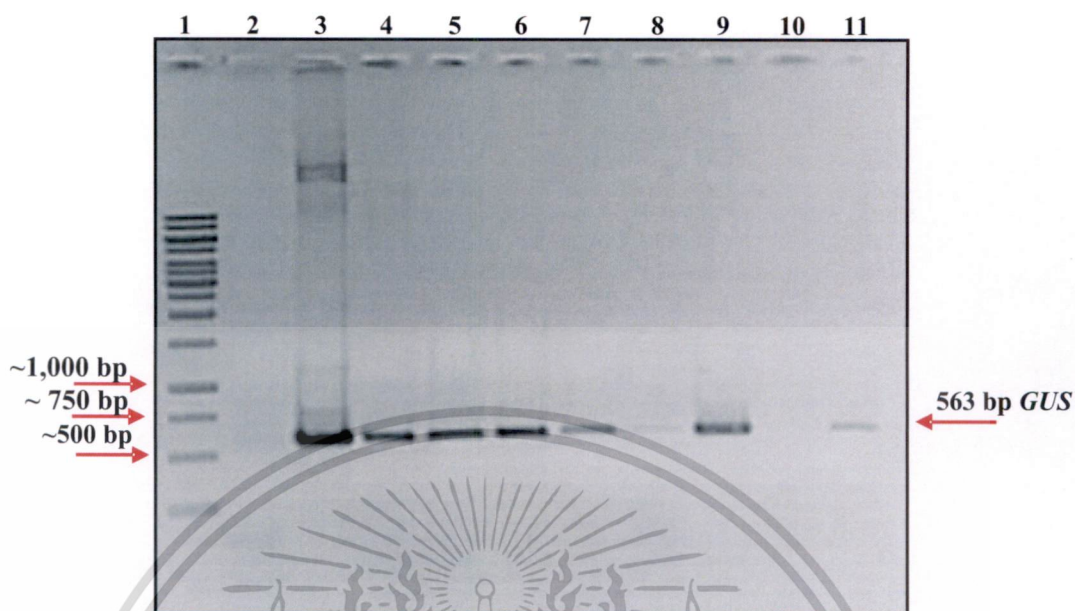


ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ *NPTII*

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1kb DNA Ladder
 ช่องที่ 2 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
 ช่องที่ 3 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR
 ช่องที่ 4-7 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR (No. 6, 8, 9 และ 14)
 ช่องที่ 8 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pBI121DFR
 ช่องที่ 9-10 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pBI121DFR (No. 79, 86)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *GUS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 563 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และ พลาสมิด pBI121DFR (ภาพที่ 4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ GUS

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

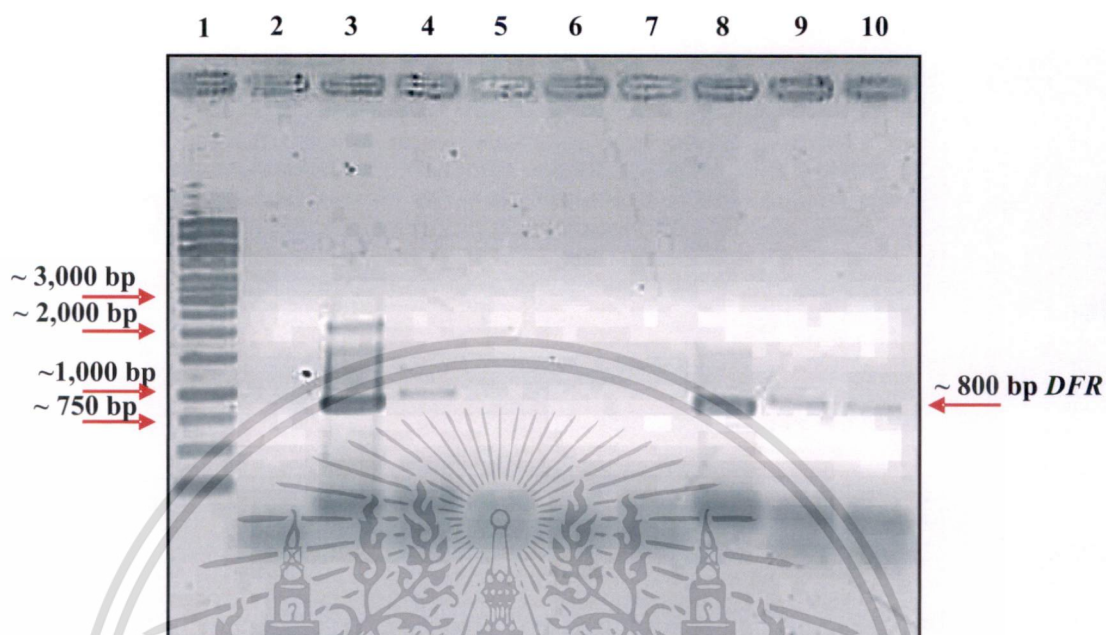
ช่องที่ 3 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

ช่องที่ 4-8 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR (No. 6, 8, 9, 24 และ 25)

ช่องที่ 9 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pBI121DFR

ช่องที่ 10-11 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pBI121DFR (No. 79, 86)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *DFR* ตั้งแต่บริเวณ โปรโมเตอร์ CaMV35S และ เทอร์มิเนเตอร์ NOS ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *DFR* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และ พลาสมิด pBI121DFR (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ CaMV35S และ NOS

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ถ่ายยีน

ช่องที่ 3 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

ช่องที่ 4-7 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน โดยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR (No. 20, 22, 23 และ 24)

ช่องที่ 8 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pBI121DFR

ช่องที่ 9-10 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน โดยพลาสมิด pBI121DFR (No. 79, 87)

จากการตรวจสอบต้นบัวหลวงที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกที่เต็มสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จำนวนทั้งสิ้น 90 ต้น ตารางที่ 4.8 พบต้นที่มียีน *GUS* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay ดิตี จำนวน 40 โคลน ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR จำนวน 25 โคลน และพลาสมิด pBI121DFR จำนวน 15 โคลน ตารางที่ 4.9 เป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่า ต้นที่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* มีจำนวน 5 โคลน ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *NPTII* มีจำนวน 11 โคลน เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR จำนวน 5 โคลน และเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pBI121DFR จำนวน 6 โคลน และต้นที่พบการมีอยู่ของยีน *DFR* จำนวน 6 โคลน เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR จำนวน 4 โคลน และเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pBI121DFR จำนวน 2 โคลน โดยในจำนวนนี้มี 3 โคลน ที่พบ 2 ยีน คือยีน *GUS* และยีน *NPTII* คือโคลนที่ 9 23 และ 24 ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และมีจำนวน 2 โคลนที่พบการมีอยู่ของยีน 2 ยีน คือยีน *NPTII* และยีน *DFR* คือโคลนที่ 79 และ 87 ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pBI121DFR ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีนทั้ง 3 ยีน คือยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน *DFR* มีจำนวน 2 โคลน ซึ่งเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR คือโคลนที่ 6 และ 20 สำหรับต้นที่พบเฉพาะยีน *NPTII* มีจำนวน 4 โคลน คือโคลนที่ 49 65 83 และ 86 และมีต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเลยจำนวน 1 โคลน เมื่อพิจารณาโดยรวมมีจำนวนต้นที่เหลือรอด 14 โคลน โดยมีตารางที่ 4.10 เป็นตารางสรุปผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน *DFR* ด้วยวิธีพีซีอาร์



ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี Gus histochemical assay ทั้งหมด 90 ต้น

วิธีการ	ต้น																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Gus assay	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90										
	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-										

+ = ต้นที่ทดสอบแล้วพบการแสดงออกของยีน *GUS*

- = ต้นที่ทดสอบแล้วไม่พบการแสดงออกของยีน *GUS*

ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งหมด 90 ต้น (ต้นที่ 1-45 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR, ต้นที่ 46-90 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR)

ต้น	วิธีการตรวจสอบ			จำนวนต้นที่เหลือ
	PCR: ยีน <i>GUS</i>	PCR: ยีน <i>NPTII</i>	PCR: ยีน <i>DFR</i>	
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	+	+	+	4
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	+	+	-	7
10	0	0	0	0
11	-	-	+	3
12	0	0	0	0
13	-	-	+	21
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	+	+	+	10
21	0	0	0	0
22	+	+	-	7
23	0	0	0	0
24	+	+	-	18
25	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ (ตาย)

+ = ต้นที่ทดสอบแล้วพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

- = ต้นที่ทดสอบแล้วไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสุโขทัยวิทยาเขตศรีนครินทร์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งหมด 90 ต้น (ต้นที่ 1-45 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR, ต้นที่ 46-90 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR)

ต้น	วิธีการตรวจสอบ			จำนวนต้นที่เหลือ
	PCR: ยีน <i>GUS</i>	PCR: ยีน <i>NPTII</i>	PCR: ยีน <i>DFR</i>	
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0
32	0	0	0	0
33	0	0	0	0
34	0	0	0	0
35	0	0	0	0
36	0	0	0	0
37	0	0	0	0
38	0	0	0	0
39	0	0	0	0
40	0	0	0	0
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
43	0	0	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	0	0	0	0
47	0	0	0	0
48	0	0	0	0
49	-	+	-	8
50	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ (ตาย)

+ = ต้นที่ทดสอบแล้วพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

- = ต้นที่ทดสอบแล้วไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งหมด 90 ต้น (ต้นที่ 1-45 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR, ต้นที่ 46-90 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR)

ต้น	วิธีการตรวจสอบ			จำนวนต้นที่เหลือ
	PCR: ยีน <i>GUS</i>	PCR: ยีน <i>NPTII</i>	PCR: ยีน <i>DFR</i>	
51	0	0	0	0
52	0	0	0	0
53	0	0	0	0
54	0	0	0	0
55	0	0	0	0
56	0	0	0	0
57	0	0	0	0
58	0	0	0	0
59	0	0	0	0
60	0	0	0	0
61	0	0	0	0
62	0	0	0	0
63	0	0	0	0
64	0	0	0	0
65	-	+	-	3
66	0	0	0	0
67	0	0	0	0
68	0	0	0	0
69	0	0	0	0
70	0	0	0	0
71	0	0	0	0
72	0	0	0	0
73	0	0	0	0
74	0	0	0	0
75	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ (ตาย)

+ = ต้นที่ทดสอบแล้วพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

- = ต้นที่ทดสอบแล้วไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งหมด 90 ต้น (ต้นที่ 1-45 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR, ต้นที่ 46-90 ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR)

ต้น	วิธีการตรวจสอบ			จำนวนต้นที่เหลือ
	PCR: ยีน <i>GUS</i>	PCR: ยีน <i>NPTII</i>	PCR: ยีน <i>DFR</i>	
76	0	0	0	0
77	0	0	0	0
78	0	0	0	0
79	-	+	+	27
80	0	0	0	0
81	0	0	0	0
82	0	0	0	0
83	-	+	-	8
84	0	0	0	0
85	0	0	0	0
86	-	+	-	4
87	-	+	+	1
88	-	-	-	7
89	0	0	0	0
90	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ (ตาย)

+ = ต้นที่ทดสอบแล้วพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

- = ต้นที่ทดสอบแล้วไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 สรุปผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งหมด 90 ต้น
จากจำนวนต้นทั้งหมด 90 ต้น พบว่ามีต้นที่รอดชีวิต 14 ต้น

พลาสมิด	จำนวนต้นที่เหลือรอด	วิธีการ/ต้นที่	6	9	11	13	20	22	24
pCAMBIA2301DFR	7	ยีน <i>GUS</i>	+	+	-	-	+	+	+
		ยีน <i>NPTII</i>	+	+	-	-	+	+	+
		ยีน <i>DFR</i>	+	-	+	+	+	-	-
		ต้นที่เพิ่มจำนวนได้	4	7	3	21	10	7	18
	จำนวนต้นที่เหลือรอด	วิธีการ/ต้นที่	49	65	79	83	86	87	88
pBI121DFR	7	ยีน <i>GUS</i>	-	-	-	-	-	-	-
		ยีน <i>NPTII</i>	+	+	+	+	+	+	-
		ยีน <i>DFR</i>	-	-	+	-	-	+	-
		ต้นที่เพิ่มจำนวนได้	8	3	27	8	4	1	7

+ = ต้นที่ทดสอบแล้วพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR* - = ต้นที่ทดสอบแล้วไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน *DFR*

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ชิ้นส่วนเริ่มต้น และแสง ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์ บุญทรริก

จากการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และแสง ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทรริก ภายใต้ปัจจัยแสง ระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ หลังจากการทดลองเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว พบว่า ชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้ง 2 ส่วน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อพิจารณาจากคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตแล้วนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้ง 2 นี้จะเริ่มพัฒนาเป็นแคลลัส โดยชิ้นส่วนจะสร้างแคลลัสขึ้นที่บริเวณรอยตัด เนื่องจากบริเวณรอยตัดมีการตอบสนองต่อสารต่างๆ ได้ก่อนบริเวณอื่นๆ และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน (กาญจนาภรณ์, 2542) โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวนี้ จะมีสีเขียว ลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น เนื่องจากแสงสีขาว มีความสามารถในการกระตุ้นสารตัวกลางที่จะเปลี่ยนเป็นรงควัตถุชนิดต่างๆ ให้กลายเป็นคลอโรฟิลล์ ทำให้แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่ที่มีแสงสีขาว สามารถเปลี่ยนเป็นสีเขียว (เซวอน และพรณี ชิโนรัชย์, 2539) และชิ้นส่วนทั้ง 2 จะให้แคลลัสลักษณะใกล้เคียงกัน เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เซลล์มีการตื่นตัว (active cell) และแบ่งเซลล์สูง จึงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Dixon and Gonzales, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองชักนำการเกิดแคลลัสในอุ้งที่พบว่า การเพาะเลี้ยงส่วนก้านใบ และต้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Seung and Seon, 2002) และการชักนำให้เกิดแคลลัสใน *Cyclamen persicum* พบว่าส่วนก้านใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนอื่นๆ (Karam and Majathoub, 2000) แต่เมื่อพิจารณาคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตระหว่างชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ พบว่าคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะสูงกว่าชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ โดยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีค่าสูงที่สุด เมื่อใช้ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ คือ 3.80 คะแนน โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ มีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น มีสีเขียว ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ มีลักษณะของแคลลัสคล้ายกับแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ มีสีเขียว เป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่น และชิ้นส่วนมีขนาดเพิ่มขึ้นทุกๆ สัปดาห์ คล้ายกับการทดลองของ Al-Juboori and Williams, 1990. โดย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการศึกษากำหนดการชักนำการเกิดแคลลัสใน Algerian Ivy (*Hedera canariensis* L.) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่มี NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนที่ได้จากชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะจะมีลักษณะที่คล้ายกับต้นแต่ในชิ้นส่วนก้านใบจากคัพพะไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว นั่นอาจเป็นเพราะตัดติดบริเวณที่สามารถชักนำเป็นต้น หรือบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญมาด้วย จึงไม่ต้องผ่านการเจริญเป็นแคลลัสก่อน

ในขณะเดียวกัน เมื่อพิจารณาผลของขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้นระหว่างชิ้นส่วนทั้ง 2 คือ ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพพะ พบว่า ชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้ง 2 ส่วน สามารถที่จะเพิ่มขนาดของชิ้นส่วนได้ในทุกสัปดาห์ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะ มีลักษณะใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพพะ โดยการเพิ่มขึ้นของขนาดชิ้นส่วนทั้ง 2 นั้น ชิ้นส่วนก้านใบจากคัพพะจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะ และบางชิ้นส่วนจากตายอด และก้านใบจากคัพพะ แคลลัสมีสีน้ำตาล บางชิ้นส่วนตาย และบางชิ้นส่วนค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ ทั้งชิ้นส่วน อีกทั้งชิ้นส่วนบางชิ้นยังมีสีเหลือง และสีชมพู โดยอาจเป็นเพราะว่าในชิ้นส่วนอาจมีสารเคมีบางชนิดที่ปล่อยออกมาทำให้ชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีขาว และสีชมพูตามลำดับได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ กุลวรา จารุพันธ์ และจันทิมา วรสัมบูรณ์ (2543) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการทดลองพบแคลลัสมีสีเขียวและสีม่วง โดยแคลลัสที่เกิดมามีสีต่างๆนั้นขึ้นอยู่กับรงควัตถุภายใน โดยแคลลัสที่มีสีเขียวมาจากรงควัตถุคลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) สีม่วงหรือแดงมาจากรงควัตถุแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) สีแดง ส้ม จากรงควัตถุแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และสีเหลือง ส้ม แดง ม่วง จากรงควัตถุเบตาไลน (betalains) ซึ่งปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง (รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541)

5.2 การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้น 0 50 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (control) มีการเกิดเป็นแคลลัส และยอด ส่วนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะมีสีน้ำตาลทั้งหมด และไม่สามารถอยู่รอดได้ และอาหาร MS ที่เติมสารไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นที่ 100 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วนยังมีเปอร์เซ็นต์การรอดอยู่ เช่นเดียวกับงานการทดลองของ รงรอง หอมหวล เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และอัญชลี วัชรินทร์วิบูลย์ (2543) ทดสอบเบญจมาศพันธุ์ค็อกกีเหลือง เมื่อนำเข้ามาเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในทุกระดับความเข้มข้นสามารถทำให้เชื้อเบญจมาศตายได้ และในการทดลองของ รงรอง หอมหวล (2545) ทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) พันธุ์ Carl Red โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* (A281/pBI121) เป็นพาหะ ซึ่งเชื้อ A281/pBI121 มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมีสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็น antibiotic resistant gene (ยีน *NPTII*) จากการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแคลลัสทั้งหมด และงานทดลองของ วันเพ็ญ ศรีทองชัย (2546) ในขั้นตอนการคัดเลือก embryogenic callus ของแดงกวาพันธุ์เจ็ดใบ คัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วนจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด ยุบตัวเป็นก้อนเหนียว และตาย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์คือ 21 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสูตรอาหารคัดเลือกที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ และขึ้นส่วนที่ใช้ เช่น ในการทดลองของประวีณา มณีรัตน์รุ่งโรจน์ สุมนทิพย์ บุนนาค และปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์ (2546) ทดลองศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงิน โดย *A. tumefaciens* พบว่า สารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้น 150 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของโพรโตคอร์ม และต้นอ่อนเอื้องเงินได้ตามลำดับ และในงานทดลองของ Yu et al (2003) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินตั้งแต่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเป็น โชมาติคเอมบริโอจากแคลลัสของมะละกอได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าที่ความเข้มข้นนี้สามารถยับยั้งการพัฒนาของ โชมาติคเอมบริโอไปเป็นยอดได้อย่างสมบูรณ์

5.3 การถ่ายยีน antisense dihydroflavonal 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกร

แบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105

การศึกษาการถ่ายยีน antisense dihydroflavonal 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ใช้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงขึ้นส่วนตายออกจากคัพภะบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน โดยมีพลาสติกทดสอบ 2 ชนิด คือ พลาสติก pCAMBIA2301DFR และพลาสติก pBI121DFR ทั้ง 2 พลาสติกนี้เป็น Binary Vector ประกอบไปเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยส่วนของยีนเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกคือยีน *NPTII* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน ยีนที่ต้องการใส่เข้าไปในต้นพืช คือยีน antisense *DFR* และยีนรายงานผลคือยีน *GUS* อยู่ระหว่าง RB (right border) และ LB (left border) โดยในพลาสมิด pBI121DFR ไม่มียีน *GUS* ในการทดลองนี้ใช้พลาสมิดทั้ง 2 ทดสอบร่วมกับความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และระยะเวลาการบ่มเชื้อ 2 ระดับ คือ 1:10 แชนาน 10 นาที และ 1:10 แชนาน 30 นาที หลังจากการถ่ายยีนนำแคลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ปริมาตร 50 มิลลิกรัม ต่อลิตร และสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ปริมาตร 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งการถ่ายยีนด้วยเชื้อแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียม นั้น ปริมาณเชื้อที่นำมาใช้มักต้องนำมาเจือจางให้ได้ปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากจะต้องกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกไปจากพืชภายหลังจากที่ T-DNA ถูกส่งเข้าไปในเซลล์ และแทรกตัวอยู่ในโครโมโซมของพืชอย่างถาวร (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2548) ซึ่งปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มากเกินไป นอกจากจะทำให้กำจัดเชื้อออกไปได้ยากแล้ว ยังมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้ ในทางตรงกันข้าม ถ้าปริมาณเชื้อมีน้อยเกินไป ก็อาจทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนต่ำลงเช่นกัน (เกษณี มณีภาส. 2546) จากนั้นนำแคลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยอด พบว่าจากการทดลองพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด คือ พลาสมิด pCAMBIA2301DFR และพลาสมิด pBI121DFR มีขนาดและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ดีที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเชื้อร่วมกับระยะเวลา 1:10 แชนาน 10 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ เกศณี มณีภาส (2546) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pBI121 ที่ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ 0.6-0.8 ซึ่งเจือจางในอัตราส่วน 1:1 1:10 1:20 1:50 1:100 และ 1:500 พบว่าชิ้นใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และพันธุ์วีเอฟ 134-1-2 ที่ได้รับการถ่ายยีนในอัตราส่วน 1:10 มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนสูงที่สุดคือ 61.17 และ 48.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase เอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยากับ X-gluc ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ไม่มีสี ได้สาร dichloro-dibromo indigo (ClBr-indigo) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ไม่คงตัว ต่อมาจะเกิด dimer ของ ClBr-indigo ทำให้เกิดสีน้ำเงินที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในเซลล์ (Stomp. 1992) โดยตรวจสอบการแสดงออกด้วยวิธี Gus histochemical assay โดยตัดชิ้นส่วนบริเวณก้านใบ และใบของต้นบัวหลวงพันธุ์บุณชกร หลังจากการถ่ายยีน และผ่านการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกนำมาตรวจ

โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลายที่มีสาร X-gluc บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ชิ้นส่วนของบัวหลวงที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และ pBI121DFR สังเกตเห็นสีน้ำเงินโดยมีการติดสีน้ำเงิน 51.19 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาในการทดลองที่ดีที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนติดสีน้ำเงิน คือ 1:10 แชนาน 30 นาที สอดคล้องกับการทดลองของ สุภา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วดี ถาวร (2548) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* พบว่าโปรโตคอร์มเมื่อเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม ซึ่งปรับความหนาแน่นของเซลล์แขวนลอย เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็น 1:10 ในอาหารที่ใส่อะซิโตไซลิ่งไกลโคความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* 2-3จุดต่อชิ้นส่วน และเกษตรคุณธ์ มณีวรรณ (2549) ศึกษาสภาวะเหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลช้าง โดยมีอัตราของการบ่มชิ้นส่วนในระยะเวลา คือ 10 20 30 40 และ 50 นาที พบว่า ที่ระยะเวลา 30 นาที มีการแสดงออกของยีน *GUS* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ และการเกิดสีน้ำตาลเงินบนชิ้นส่วนยังพบการกระจายที่ไม่สม่ำเสมอ อาจเนื่องมาจากมีการถ่ายยีนเฉพาะบางส่วนของเนื้อเยื่อ โดยบางเซลล์ได้รับยีน และบางเซลล์ไม่ได้รับยีน (Chyi and Phillips. 1987) สอดคล้องกับการทดลองของพิสิฐ ชัยประเดิมศักดิ์ (2546) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ของยาสูบ พบจุดสีน้ำตาลเงินทั่วเนื้อเยื่อราก แต่ในใบ พบเฉพาะบางส่วนของใบเท่านั้น เช่นเดียวกับ Chai *et al* (2002) รายงานการถ่ายยีน *GUS* เข้าสู่กล้วยไม้ฟาเลนนิออปซิส พบว่าส่วนของราก มีการแสดงออกของจุดสีน้ำตาลเงินทั่วเนื้อเยื่อ ในขณะที่ส่วนของใบ พบสีน้ำตาลเงินเฉพาะบริเวณรอยตัดเท่านั้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากยีน *GUS* ที่ถูกถ่ายเข้าสู่บัวหลวงอยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ CaMV35S ซึ่งสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ในทุกส่วนของพืชแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยเฉพาะในส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ลำเลียง (Martin *et al.* 1992) ดังนั้นเนื้อเยื่อที่นำมาจากส่วนที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ β -glucuronidase ได้ ดังนั้นการใช้เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต เช่น ต้นอ่อนหรือใบอ่อนจะสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาของยีน *GUS* ได้ชัดเจนกว่า (Stopm. 1992) ในเนื้อเยื่อของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pBI121DFR ที่ตรวจสอบพบการแสดงออกของยีน *GUS* แต่เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ไม่พบยีน *GUS* อาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อของบัวมียางเวลาถูกตัด และเมื่อนำมาตรวจสอบกับสารละลาย X-gluc จึงอาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ β -glucuronidase ทำให้เกิดสีน้ำตาลเงินบริเวณรอยตัดเท่านั้น

เมื่อนำต้นที่เหลือรอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก จำนวน 14 โคลน มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ พบต้นที่มียีน *GUS* จำนวน 5 โคลน ต้นที่มียีน *NPTII* จำนวน 11 โคลน และต้นที่มียีน *DFR* จำนวน 6 โคลน โดยในจำนวนนี้มีจำนวน 2 โคลน ที่พบทั้ง 3 ยีน คือยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน *DFR* และยังมีต้นที่ตรวจแล้วไม่พบยีน *DFR* แต่ตรวจพบยีน *NPTII* และยีน *GUS* ซึ่งมีจำนวน 3 โคลน และต้นที่ตรวจพบเฉพาะยีน *NPTII* มีจำนวน 4 โคลน และต้นที่ตรวจพบ 2 ยีนคือ ยีน *NPTII* และยีน *DFR* มีจำนวน 2 โคลน ทั้งหมดที่เกิดขึ้นอาจอธิบายได้ว่าการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะนั้น ในขั้นตอนการนำชิ้นส่วนของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช มักจะนำส่วนของ right border ของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชก่อน (Sheng and Citovsky. 1996) ซึ่ง

ในพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และ pBI121DFR ที่ใช้ในการทดลองนี้ยีน *NPTII* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งเป็นด้านที่จะเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซมของเซลล์พืชก่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ส่วนของยีน *DFR* ที่อยู่บริเวณด้าน left border อาจเกิดการขาดหายไปบางส่วน จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ นอกจากนี้ยังพบต้นที่ตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วพบยีน *DFR* แต่ไม่พบยีน *NPTII* และยีน *GUS* จำนวน 2 โคลน อาจเนื่องจากเหตุผลหลายประการซึ่ง Durand-Tardif *et al.* (1985) อธิบายว่าการที่ถ่ายยีนเข้าไปในช่วงแรกอาจจะมีทั้งสองยีนอยู่ในเซลล์เดียวกัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงพืชต่อไปเป็นเวลานาน และพืชมีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์ใหม่ ทำให้มีโอกาที่ยีนที่ถ่ายเข้าไปบางส่วนขาดหายไปในระหว่างนั้นสังเกตได้จากการกลับมาตรวจสอบต้นที่เคยตรวจพบยีน เมื่อขยายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นมีบางต้นที่ได้ไม่มียีนอยู่หรือตรวจพบเพียงยีนเดียว นอกจากนี้ยังมีต้นที่ตรวจไม่พบยีนใดเลย แต่สามารถโตเป็นต้นได้ในอาหารคัดเลือก มีจำนวน 1 โคลน อาจเนื่องมาจากเซลล์ประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น และอาจมีบางเซลล์ในชั้นเซลล์ที่ไม่ได้รับสารถ่ายยีน เมื่อนำมาคัดเลือกบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้บางส่วน แต่เนื้อเยื่อเซลล์ที่อยู่เหนือขึ้นไป ที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหารโดยตรง จะได้รับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยการเคลื่อนย้ายของสารในชั้นส่วน และความเข้มข้นของสารที่เคลื่อนย้ายนั้นอาจมีการเจือจาง อีกทั้งเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เซลล์บางเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง จึงทำให้เจริญเติบโตขึ้นมาได้ (Catlin, 1990)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ชิ้นส่วนเริ่มต้น และแสง ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ภายใต้ปัจจัยสีของแสง ระหว่างแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด คือ 3.80 คะแนน แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ฉ่ำน้ำ และชิ้นส่วนมีลักษณะที่คล้ายกับต้น แต่ในชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากคัพภะ ภายใต้แสงสีแดง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้งสองชิ้นส่วน แต่ชิ้นส่วนทั้งสองไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะไปเป็นต้น โดยชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ

ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์มณฑริกไม่สามารถอยู่รอดได้

การถ่ายยีน antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะ เป็นเวลา 2 เดือนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น การถ่ายยีนจะใช้พลาสติก 2 ชนิด พบว่าการถ่ายยีนโดยพลาสติก pCAMBIA2301DFR ความเข้มข้น และระยะเวลาบ่มร่วมกับเชื้อที่ทำให้แคลลัสมีขนาดการเจริญเติบโตดีที่สุดคือ 1:10 แชนนาน 10 นาที ส่วนการถ่ายยีนโดยพลาสติก pBI121DFR ความเข้มข้น และระยะเวลาบ่มร่วมกับเชื้อนั้น ชิ้นส่วนมีขนาดการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยการถ่ายยีนด้วยพลาสติกทั้งสอง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 9.33 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาคือ 1:10 แชนนาน 10 นาที เป็นช่วงที่ดีที่สุด

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธี Gus histochemical assay หลังจากการถ่ายยีน โดยใช้ส่วนของก้านใบ และใบ พบว่า การถ่ายยีนด้วยพลาสติก pCAMBIA2301DFR มีการติดสีน้ำเงิน 49.59 เปอร์เซ็นต์ และพลาสติก pBI121DFR มีการติดสีน้ำเงิน 20 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นร่วมกับระยะเวลาในการทดลองที่ดีที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนติดสีน้ำเงิน คือ 1:10 แชนนาน 30 นาที มีคะแนนการติดสีน้ำเงิน 35.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอน ห้ามมิให้นำไปใช้ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบระหว่างพลาสมิด 2 ชนิด ร่วมกับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทดสอบ จะเห็นว่า พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ขึ้นส่วนดีดีสีน้ำเงินดีที่สุด คือ 51.19 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาการบ่มเชื้อ 1:10 แขนาน 30 นาที และพลาสมิด pBI121DFR ขึ้นส่วนไม่มีความแตกต่างของระยะเวลาการบ่มเชื้อ คือ ขึ้นส่วนดีดีสีน้ำเงินเท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์

จากการตรวจสอบต้นบัวหลวงพันธุ์มณฑริกที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จำนวนทั้งสิ้น 90 ต้น พบต้นที่มียีน *GUS* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี Gus histochemical assay ดีดีสี จำนวน 41 โคลน และการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ ต้นที่มียีน *GUS* จำนวน 5 โคลน ต้นที่มียีน *NPTII* จำนวน 11 โคลน และต้นที่มียีน *DFR* จำนวน 6 โคลน โดยในจำนวนนี้มี 2 โคลน ที่พบทั้ง 3 ยีน คือยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน *DFR* โดยการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301DFR และมี 2 โคลนที่พบ 2 ยีนคือยีน *NPTII* และยีน *DFR* โดยการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBI121DFR เมื่อพิจารณาจากจำนวนต้นที่เหลือรอด 14 โคลน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กวิหาญ พลหาญ. 2534. นาบัวตัดดอก อ.บางกรวย จ.นนทบุรี. วารสารเกษตร. 15(11): 37 – 47.
- กสิน สุวตะพันธ์. 2500. บัวนาพาพันธ์. พฤษชาติ. 1(1): 40 – 47.
- กาญจนา ขจรเฉลิมศักดิ์ และ ปิยะพงษ์ เอื้อจิระพงษ์พันธ์. 2543. “การถ่ายยีนในข้าวโพดโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และเครื่องยิง”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547. “ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ verano” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- เกษณี มณีภาส. 2546. “การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยการใช้ minibinary vector.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกษศนธ์ มณีวรรณ. 2549. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้สกุลช้าง โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens*.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- กุลวรา จารุพันธ์ และ จันทิมา วรสัมบูรณ์. 2543. “ผลของการควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชในสภาพปลอดเชื้อ”. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กัลยาณี มีเพียร และ จริยา เบญจานุกรม. 2542. “การถ่ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าว โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กณิดา เลขะกุล. 2535. บัว : ราชนิพนธ์ไม้หน้า. มุลนิธิส่วนหลวง ร.9. กรุงเทพมหานคร.
- คำบุญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จารีย์ หอยทอง. 2519. “การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิตเกษม เที่ยงจิตต์. 2545. “การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสบัวหลวงพันธุ์บุณทริก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชสวน. บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- จินตนา ไทยลิมทอง และ ลาวัลย์ สุรมนตรี. 2536. “การใช้ซิลเวอร์ไรโอซัลเฟตก่อนเก็บเกี่ยวเพื่อยืดอายุการปักแจกันของดอกบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชุติมา ประเสริฐสินธุ์ ประชา กองสุข และ ปิญจรรย์ คุมพล. 2541. “ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ไชยา-ลาวัลย์. 2541. การปลูกบัว. พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.
- จิตติมา วงษ์การคำ และ สุภาลัย ไชยสุด. 2544. “การถ่ายยีนในหญ้าโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ณพพร ดำรงศิริ. 2530. พฤษกษอนุกรมวิธาน. กรุงเทพมหานคร: นำงการพิมพ์.
- ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย. 2539. “ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ในสภาพหลอดทดลอง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เทิดศักดิ์ ประถมวงษ์ และ ชำรงค์ เงามู่ทอง. 2544. “การถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวเหนียวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทวัน บุญยะประภัสร์. 2541. สมุนไพร: ไม้พื้นบ้าน. กรุงเทพมหานคร: ประชาชน.
- บุญเกื้อ หาราชย์. 2537. “การเปรียบเทียบสูตรสารละลายปักแจกันเพื่อยืดอายุการใช้งานของดอกบัว.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราการ กระจินทอง สุกัญญา ลำลีทอง และ สุนิสา วनावรรค์มี. 2543. “การย้ายยีนในข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียและเครื่องยิง”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้งเฮาส์.
- ประสิทธิ์ ศรีอะริยะวงศ์ และ พงศธร กิมเฮง. 2542. “การถ่ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium Tumefaciens*”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรีชา ประเทพา. 2543. เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยี พันธุวิศวกรรม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิสิฐ ชัยประเดิมศักดิ์. 2546. การศึกษาวิธีการถ่ายยีน Chalcone reductase (chr) และ Dihydroflavonol-4-reductase (dfr) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยอะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (พันธุศาสตร์), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พัชรินทร์ เจริญอุทัยธรรม เรณู เย็นเกษ และ วิไลพร เคลือบหิรัญ. 2540. “การศึกษาการงอกเป็นต้น และการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในข้าวพันธุ์ไทย”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ภัทวดี ภัคดีงาม. 2548. “การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และแสงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจินิกส์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รอรอง หอมหวล. 2545. “เทคนิคการถ่ายยีนในกุหลาบ.” ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รวีรัฐ บัวทอง. 2552. “การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดเอ็มบริโอจินิกเซลล์ส์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.” ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รังสฤษดิ์ กาวีตะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชนี้ ฉวีราช. 2532. พรรณไม้หน้า. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 17(3): 147 – 151 (2532).

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

วาสนา มิตรานนท์. 2527. “การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง (*Nelumbo Adans.*) ในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2550. “การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และปัจจัยแสง ที่มีต่อการเกิดแคลลัสของ บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก และการทดสอบความเข้มข้นสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่เหมาะสม สำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีน.” ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิชัย ภูมิปัญญาวานิช. 2543. “การเพาะเลี้ยงคัพภะของบัวหลวง 2 ชนิด.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเศษฐ คำสุวรรณ. 2535. การปลูกบัว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. 2520. ทะเบียนพันธุ์ไม้ประดับ. กรุงเทพมหานคร : บริษัทการพิมพ์.

สายชล เกตุษา. 2531. เทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวของดอกไม้. กรุงเทพมหานคร : บริษัทการพิมพ์.

สุปราณี วินิชานนท์. 2540. บัวประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี : สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. พรรณไม้หน้า. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์ศิริรัตน์. 2533. เทคนิคการปลูกบัว. กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เสริมลาภ วสุวัต. 2537. บัวไม้ดอกไม้ประดับ. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2547. การถ่ายทอดยีน. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. เล่มที่ 28.

กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

Agarwal, S., K. Kanwar, N. Saini and R.K. Jain. 2004. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation and regeneration of *Morus alba* L. **Scientia Horticulturae**. 100 :183–191.

Alt-Moerbe, J., P. Nedderman, J.V. Lintig, E.W. Weiler and J. Schroder. 1988. “Temperature-sensitive step in Ti-plasmid vir region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*.” **Molecular and General Genetics**. 213:1-8.

Backer, C.A. and R.C. Bakhuizen Van Den Brink. 1963. **Flora of Java**. Netherland (Groningen): N.V.P. Noordhoff.

Beld, M., C. Martin, H. Huits, R. Stuitje and A.G.M. Gerats. 1989. “Flavonoid Synthesis in *Petunia hybrida* :partial characterization of dihydroflavonal 4-reductase genes.” **Plant Mol biol** 13: 491-502

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Burkill, I.H. 1966. **A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula**. Vol. 11. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Kuala Lumpur.
- Byrne, M.C., R.E. McDonnell, M.S. Wright and M.G. Carnes. 1987. "Stain and cultivar specificity in *Agrobacterium*-soybean interaction". **Plant Cell Tiss. Org.Cult.** 8: 3-15.
- Catlin, D.W. 1990. The effect of antibiotics on the inhibition of induction and plant regeneration from cotyledons of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) **Plant Cell Rep.** 9:285-288.
- Chaubaud, M., J.E. Passialore and F. Cannon. 1988. "Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation." **Plant Cell Rep.** 7: 512-516.
- Chai.M.L.,C.J. Xu, K.K. Senthil.J.Y. Kim and D.H. Kim.2002. "Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*." **HortScience.** 96:213-224.
- Charest, P.J., L.A. Holbrook, J. Gabard, V.N. Iyer and B.L.Miki. 1988. *Agrobacterium* mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. **Theor. Appl. Genet.** 75: 438-445.
- Chen, L.H., X.W. Wang, W.J. Zhang, X.D. Zhang, D.F. Hu, and G.T. Liu. 1999."Transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with herbicide-resisitant *PSPs* gene." **Acta Genetica Sinica** 16:239-243.
- Chesnokov, Y.V., A. Meister and R. Manteuffel. 2002. "A chimeric green fluorescent protein gene as an embryogenic marker in transgenic cell culture of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv." **Plant Science.** 162:59-77.
- Chyi. Y and G.C. Phillips. 1987. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. **Plant Cell Rep.** 6: 105-108.
- Core, L.E. 1955. **Plant Taxonomy**. Englewood Cliffs. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 459 p.
- De Kathen, A. and H.J. Jacobsen. 1990. "*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors." **Plant Cell Rep.** 9: 276-279.
- Durand-Tardif, M., R. Broglic, J. Slightom and D. Tepfer. 1985. Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*. **J. Mol. Biol.** 186: 557-564.

- Dwight, T. 1990. "Transgenic tobacco and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves". **Plant Mol. Biol.** 14:261-268.
- Eiichiro, O., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi, and Y. Tanaka. 2006. "Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway." **Plant Biology**. 29: 11075 – 11080.
- Fischer, D., L. Stich, and H. Grisebach. 1988. "Purification and Characterization of (+)-dihydroflavonal (3-hydroxy flavanone) 4-reductase from flowers of *Dalia variabilis*." **Arch. Biochem. Biophys.** 264: 40-47.
- Forkmann, G and B. Ruhnau 1987. "Distinct substrate specificity of dihydroflavonal 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. Z." **Naturforsch.** 42c: 1146-1148.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, N.L. Hoffman, and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial gene in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80: 4803-4807.
- Gilbert, S. 1982. "The culture of water lilies and water lotuses." **Horticulture**. LX(8): 16 – 23.
- Godwin, I.D., T. Gordon, B. Ford-Loyd and H.J. Newberry. 1991. "The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Rep.** 9: 671-675.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichlitz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science** 227: 1229-1231.
- 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(9) : 648-654.
- Jacobsen, H.J. 1993. "Biotechnology in grain legumes. Current state and critical remarks." **Grain Legumes (Paris)**. 2: 12-13.
- Johnson, E.T, S. Ryu, H. Yi, B. Shin, H. Cheong and G. Choi. 2001. "Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonal 4-reductase" **Plant J.** 325-333.

- Jonsson, E.T., H.K. Yi, B.C. Shin, B.J. Oh, H.S. Cheong and G. Choi. 1999. "Cymbidium hybrida dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins." **Plant Journal**. 19: 81-85.
- Kanrar, S., J.C. Verkateswan, P.B. Kirti and V.L. Chopra. 2002. "Transgenic expression of hevein, the rubber tree, in indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*". **Plant Science**. 162:441-448.
- Khan, M.S. and P. Maliga. 1999. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plant. **Nat. Biotechnology**. 17: 910-915.
- Klein, T.M., E.D. Wolf, R. Wu and J.C. Sanford. 1987. "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells". **Nature** 327: 70-73.
- 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.
- Lin, J., J. -. 1995. Electrotransformation of *Agrobacterium*, in Method in Molecular Biology,47,Nickoloff,J.A.,ed., Humana Press, Totowa, NJ,171
- Lin, J.,J. Ma., N. Assad-Garcia and J. Kuo. 1996. Hygromycin B as an efficient antibiotic for the selection of transgenic plants. 18(2): 47-49.
- Li, X., S. F. Krasnyanski and S. S. Korbarban. 2002. "Optimization of the uidA gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*." **Plant Physiology and Biochemistry**. 40: 453 – 459.
- Madhuri, G. and R. Reddy. 1999. Plant biotechnology of flavonoids. **Plant Biotechnology**. 16: 179-199.
- Mahadtanapuk, S., N. Topoonyanont, T. Handa, M. Sanguansermisri and S. Anuntalabhochai. 2005. "Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using retarded shoots." **Plant Biotechnology**. 23 : 233–237.
- Martens, S., T. Teeri and G. Forkmann. 2002. "Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductase from various plants." **FEBS Letters**. 531: 543-548.

- Martin, C., R. Carpenter, H. Sommer, H. Saedler and E.S. Coen. 1985. "Molecular analysis of insability in flower pigmentation of *A. majus*, following isolation of the pallida locus by transposition tagging." **EMBO J.** 4:1625-1630
- Martin, T., R.V. Wohner, S. Hummel, L. Willmitzer and W.B. Frommer. 1992. "The gus reporter system as a tool to study plant gene expression". pp. 23-43. In Gallagher, ed. *Gus Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press, INC. London.
- Mathais, R.J. and L.A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). **Plant Science.** 46: 217-223.
- McCabe, D., W. Swain, B. Martinell and P. Christou. 1988. "Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration." **Bio/Technology.** 6: 923-926
- Melcher, L.S., A. J.G. Regenburt-Tuink, R.A. Schilperoort and P.J.J. Hooykaas. 1989. "Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression." **Mol. Microbiol.** 3: 969-977.
- Meyer, P., I. Heidemann, G. Forkmann and H. Saedler. 1987. "A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene." **Nature.** 330: 677-678.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture." **Physiologia Plantarum.** 15 : 473-497.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen. 1990. "Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans." **Plant Cell.** 2: 279-289.
- Nilsson, O., T. Alden, F. Sitbon, C.H.A. Little, V. Chalupa, G. Sandberg and O. Olsson. 1992. Spatial pattern of CaMV35S promoter-luciferase fusion in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. **Transgenic Res.** 1: 209-220.
- Owens, L.D. and A.C. Smigocki. 1988. "Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds." **Physiology Plant.** 88: 570-573.
- Pang, S.Z. and J.C. Sanford. 1988. "*Agrobacterium*-mediated gene transfer in papaya. J. Amero." **Soc. HortScience** 113: 287-291.

Pherobase. 2005. Acetosyringone.

[Online] Available : <http://www.pherobase.com/database/compounds-detail-acetosyringone.html>.

Polashock, J.J., R.J. Griesbach, R.F. Sullivan, and N. Vorsa. 2002. "Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco." **Plant Science**. 163: 241-251.

Potrykus, I. and G. Spangenberg. 1995. *Gene Transfer to Plants*. Springer-Verlag, Berlin. 361p.

Qiu, D., G. Diretto, R. Tavarza and G. Giuliano. 2006. "Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD." **Scientia Horticulturae**. 112 :172–175.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniast. 1989. "Molecular Cloning a Laboratory Cold Spring Harbor". Newyork: Cold Spring Harbor Press.

Setsuko, S., K. Takahashi, Y. Sato and M. Sakuta. 2004. "Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-Anthocyanin-Producing Species in the Caryophyllales." **Plant and Cell Physiology**. 45(9):1290 – 1298.

Sheikholeslam, S. N. and D.P. Week. 1987. "Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*." **Plant Mol. Biol.** 8: 291-298.

Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **Plant Cell** 8: 1699-1710.

Shou, S.-Y., L.-X. Miao, W.-S. Zai, X.-Z. Huang and D.-P. Gou. 2008. Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*). **Biologia Plantarum** 52(3):529-532.

Sorokin, A.P., X.Y. Ke, D.F. Chen and M.C. Elliott. 2000. "Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation." **Plant Science**. 156:227-233.

Spence, P.A. and G.H.N. Towers. 1988. "Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*." **Phytochemical**. 27: 2781-2785.

Stachel, S.E., E. Messens, M. van Montagu and P. Zambryski. 1985. "Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*." **Nature**. 318: 624-629.

- Stanton B. G. 2005. "Gene exchange by design Agricultural biotechnology." *Nature*. 433: 583-584.
[Online] Available : http://www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig_tab/433583a_F2.html. 26/05/2007.
- Stomp,A.M. 1992. "Histicchemical localization of β –glucuronidase." pp.103-113. In S.R. Gallagher (eds) *GUS Protocol: Using the gus gene as a reporter of gene expression*. Academic Press, Sandiago, California.
- Van der Krol, A.R., L.A. Mur, M.M. Beld, J.N.M. Mol and A.R. Stuitje. 1990. "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." *Plant Cell*. 2: 291-299.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ 1 ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.30
Myo – inositol	100.00
Nicotinic	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.40
Glycine	2.00
Sucrose	3000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 อาหาร YM สำหรับเลี้ยงเชื้อ

Material	1 ลิตร
Mannitol	10 กรัม
Yeast extract	0.4 กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.5 กรัม
$MgPO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 กรัม
NaCl	0.1 กรัม
Then pH and bring up to volume	
pH	7
agar	15 กรัม
Put agar (solid medium) in an autoclave bottle	

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลาย

สาร	ละลายด้วย	เก็บที่
BA (1mg/ml) (6-Benzylaminopurine)	BA 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1N KOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร	4°C
NAA (1mg/ml) (Naphthalene acetic acid)	NAA 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย absolute ethanol 1 มิลลิลิตร เติม 1N KOH ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH 6.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร	4°C

ตารางที่ 4 การเตรียม stock ของ X-gluc

สาร	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ชั่งสาร (กรัม)
0.1 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (pH 7.0)	100	13.799
0.1 M potassium ferricyanide	10	3.2925
20 mM potassium ferrocyanide	50	4.2239
0.2 M Na_2EDTA	10	3.7224

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลาย buffer ที่ใช้เตรียม X-gluc

สาร	ปริมาตรดูดจาก stock (มิลลิลิตร)
H ₂ O	8.4
50mM NaPO ₄	10
0.5mM potassium ferricyanide	0.1
0.5mM potassium ferrocyanide	0.5
10 mM Na ₂ EDTA	1.0
total	20

Filter-sterilize using 0.2 micro filter. เก็บไว้ในที่มืด 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียม X-gluc จากตารางที่ 4 และ 5

1. เตรียม X-gluc substrate โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide จำนวน 5 มิลลิกรัม ละลายใน dimethylformamide 50 ไมโครลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งหรือเก็บ stock ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
2. เติม X-gluc substrate ที่ได้จากข้อ 1 ลงในสารละลาย buffer ในตารางที่ 5 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
3. เติม triton-X 100 (Tween 20) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมได้ เก็บไว้ในที่มืด บนน้ำแข็ง
4. นำมาทดสอบกับเนื้อเยื่อโดยหยดสารละลายให้ท่วมเนื้อเยื่อที่ทดสอบ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเกิดสีน้ำเงิน
5. ล้างเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ข.

ตารางที่ 1 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้าน ใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.04000	0.01333	0.40	0.7569 ^{ns}
A	1	0.01333	0.01333	0.40	0.5447 ^{ns}
B	1	0.01333	0.01333	0.40	0.5447 ^{ns}
A*B	1	0.01333	0.01333	0.40	0.5447 ^{ns}
Error	8	0.26666	0.03333		
Total	11	0.30666			

Grand mean = 2.966

CV = 6.15%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้าน ใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.03666	0.01222	0.41	0.7520 ^{ns}
A	1	0.00333	0.00333	0.11	0.7475 ^{ns}
B	1	0.03000	0.03000	1.00	0.3466 ^{ns}
A*B	1	0.00333	0.00333	0.11	0.7475 ^{ns}
Error	8	0.24000	0.03000		
Total	11	0.27666			

Grand mean = 2.916

CV = 5.93%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เพื่อการศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้าน ใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณทริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.03666	0.01222	0.24	0.8630 ^{ns}
A	1	0.00333	0.00333	0.07	0.8028 ^{ns}
B	1	0.00333	0.00333	0.07	0.8028 ^{ns}
A*B	1	0.03000	0.03000	0.60	0.4609 ^{ns}
Error	8	0.40000	0.05000		
Total	11	0.43666			

Grand mean = 2.783

CV = 8.03%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้าน ใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณทริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.33000	0.11000	1.57	0.2705 ^{ns}
A	1	0.27000	0.27000	3.86	0.0851 ^{ns}
B	1	0.03000	0.03000	0.43	0.5311 ^{ns}
A*B	1	0.03000	0.03000	0.43	0.5311 ^{ns}
Error	8	0.56000	0.07000		
Total	11	0.89000			

Grand mean = 2.750

CV = 9.62%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณชกริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.48562	0.16187	0.81	0.5238 ^{ns}
A	1	0.02520	0.02520	0.13	0.7319 ^{ns}
B	1	0.07520	0.07520	0.38	0.5570 ^{ns}
A*B	1	0.38520	0.38520	1.92	0.2028 ^{ns}
Error	8	1.60166	0.20020		
Total	11	2.08729			

Grand mean = 2.720

CV = 16.44 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณชกริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 12

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	2.19500	0.73166	1.49	0.2891 ^{ns}
A	1	1.40083	1.40083	2.85	0.1296 ^{ns}
B	1	0.14083	0.14083	0.29	0.6068 ^{ns}
A*B	1	0.65333	0.65333	1.33	0.2819 ^{ns}
Error	8	3.92666	0.49083		
Total	11	6.12166			

Grand mean = 2.933

CV = 23.88%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตาออก และก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 14

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	3.60000	1.20000	2.18	0.1684 ^{ns}
A	1	1.61333	1.61333	2.93	0.1254 ^{ns}
B	1	0.65333	0.65333	1.19	0.3078 ^{ns}
A*B	1	1.33333	1.33333	2.42	0.1584 ^{ns}
Error	8	4.40666	0.55083		
Total	11	8.00666			

Grand mean = 2.933

CV = 25.30%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 8 วิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตาออก และก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 16

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	7.89895	2.63298	7.92	0.0088 ^{ns}
A	1	4.62520	4.62520	13.92	0.0058 ^{ns}
B	1	0.42187	0.42187	1.27	0.2925 ^{ns}
A*B	1	2.85187	2.85187	8.58	0.0190 ^{ns}
Error	8	2.65833	0.33229		
Total	11	10.55729			

Grand mean = 2.879

CV = 20.02%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.02895	0.00965	1.10	0.4034 ^{ns}
A	1	0.02340	0.02340	2.67	0.1409 ^{ns}
B	1	0.00187	0.00187	0.21	0.6561 ^{ns}
A*B	1	0.00367	0.00367	0.42	0.5355 ^{ns}
Error	8	0.07013	0.00876		
Total	11	0.09909			

Grand mean = 0.280

CV = 33.34 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 10 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจาก คัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.07182	0.02394	7.24	0.0115 ^{ns}
A	1	0.00240	0.00240	0.73	0.4184 ^{ns}
B	1	0.06900	0.06900	20.86	0.0018*
A*B	1	0.00040	0.00040	0.12	0.7344 ^{ns}
Error	8	0.02646	0.00330		
Total	11	0.09829			

Grand mean = 0.444

CV = 12.94 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ในชื่อของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโคร โมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.10782	0.03594	3.77	0.0591 ^{ns}
A	1	0.00100	0.00100	0.11	0.7533 ^{ns}
B	1	0.10640	0.10640	11.17	0.0102*
A*B	1	0.00040	0.00040	0.04	0.8411 ^{ns}
Error	8	0.07620	0.00952		
Total	11	0.18402			

Grand mean = 0.602

CV = 16.19 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 12 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโคร โมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.15802	0.05267	1.83	0.2205 ^{ns}
A	1	0.12200	0.12200	4.23	0.0738 ^{ns}
B	1	0.02900	0.02900	1.01	0.3453 ^{ns}
A*B	1	0.00700	0.00700	0.24	0.6353 ^{ns}
Error	8	0.23080	0.02885		
Total	11	0.38882			

Grand mean = 0.727

CV = 23.34 %

^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.28280	0.09426	1.62	0.2602 ^{ns}
A	1	0.00053	0.00053	0.01	0.9261 ^{ns}
B	1	0.28213	0.28213	4.84	0.0589 ^{ns}
A*B	1	0.00013	0.00013	0.00	0.9630 ^{ns}
Error	8	0.46586	0.05823		
Total	11	0.74866			

Grand mean = 0.956

CV = 25.22 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 14 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 12

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	0.93253	0.31084	2.70	0.1161 ^{ns}
A	1	0.14520	0.14520	1.26	0.2939 ^{ns}
B	1	0.71053	0.71053	6.17	0.0378 ^{ns}
A*B	1	0.07680	0.07680	0.67	0.4376 ^{ns}
Error	8	0.92053	0.11506		
Total	11	1.85306			

Grand mean = 1.273

CV = 26.63 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 14

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	1.57906	0.52635	3.68	0.0624 ^{ns}
A	1	0.91853	0.91853	6.42	0.0350 ^{ns}
B	1	0.56333	0.56333	3.94	0.0824 ^{ns}
A*B	1	0.09720	0.09720	0.68	0.4336 ^{ns}
Error	8	1.14400	0.14300		
Total	11	2.72306			

Grand mean = 1.456

CV = 25.96 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 16 วิเคราะห์ผลขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบ จากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) สัปดาห์ที่ 16

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	3	3.60146	1.20048	6.08	0.0185 ^{ns}
A	1	2.28813	2.28813	11.59	0.0093 ^{ns}
B	1	1.25453	1.25453	6.36	0.0358 ^{ns}
A*B	1	0.05880	0.05880	0.30	0.6001 ^{ns}
Error	8	1.57920	0.19740		
Total	11	5.18066			

Grand mean = 1.656

CV = 26.81 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณทรึก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 1

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.00000	0.00000	-	-
Error	10	0.00000	0.00000		
Total	14	0.00000			

Grand mean = 0.000

CV = 0.00%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 18 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณทรึก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1065.72266	266.43066	1.97	0.1760 ^{ns}
Error	10	1355.57333	135.55733		
Total	14	2421.29600			

Grand mean = 16.240

CV = 51.76 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 19 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณทรึก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 3

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	3244.65600	811.16400	28.25	<.0001**
Error	10	287.12000	28.71200		
Total	14	3531.77600			

Grand mean = 28.240

CV = 18.97 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
หากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณทริก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1970.82666	492.70666	23.72	<.0001**
Error	10	207.73333	20.77333		
Total	14	2178.56000			

Grand mean = 39.600

CV = 11.50%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 21 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณทริก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 5

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1886.70933	471.67733	13.41	0.0005**
Error	10	351.78666	35.17866		
Total	14	2238.49600			

Grand mean = 42.160

CV = 14.06%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 22 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณทริก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1815.53066	453.88266	5.97	0.0102*
Error	10	760.61333	76.06133		
Total	14	2576.14400			

Grand mean = 42.920

CV = 20.31%

เอกสาร* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95% อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 23 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 7

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	2335.88266	583.97066	3.51	0.0490*
Error	10	1665.65333	166.56533		
Total	14	4001.53600			

Grand mean = 45.360

CV = 28.45%

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 24 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	3113.52000	778.38000	4.58	0.0233*
Error	10	1700.32000	170.03200		
Total	14	4813.84000			

Grand mean = 48.800

CV = 26.72%

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 25 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 9

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	4758.25066	1189.56266	6.22	0.0089**
Error	10	1912.82666	191.28266		
Total	14	6671.07733			

Grand mean = 55.586

CV = 24.88%

เอก** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 99% อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 26 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	6152.02933	1538.00733	7.35	0.0050**
Error	10	2091.92000	209.19200		
Total	14	8243.94933			

Grand mean = 64.893

CV = 22.28%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 27 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 1

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.06049	0.01512	36.01	0.0001**
Error	10	0.00420	0.00042		
Total	14	0.06469			

Grand mean = 0.287

CV = 7.13%

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 28 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.06049	0.01512	36.01	0.0001**
Error	10	0.00420	0.00042		
Total	14	0.06469			

Grand mean = 0.28733

CV = 7.13%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 29 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 3

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.15869	0.03967	12.17	0.0007**
Error	10	0.03260	0.00326		
Total	14	0.19129			

Grand mean = 0.4193

CV = 13.61%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 30 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	0.95722	0.23930	19.16	0.0001**
Error	10	0.12486	0.01248		
Total	14	1.08209			

Grand mean = 0.530

CV = 21.05%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 31 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 5

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.07433	0.26858	17.69	0.0002**
Error	10	0.15180	0.01518		
Total	14	1.22613			

Grand mean = 0.583

CV = 21.12%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 32 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.26390	0.31597	18.56	0.0001**
Error	10	0.17026	0.01702		
Total	14	1.43417			

Grand mean = 0.638

CV = 20.43%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 33 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 7

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	1.92546	0.48136	30.15	0.0001**
Error	10	0.15966	0.01596		
Total	14	2.08513			

Grand mean = 0.663

CV = 19.04 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 34 วิเคราะห์ผลขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ สัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
treatment	4	2.81804	0.70451	39.73	0.0001**
Error	10	0.17733	0.01773		
Total	14	2.99537			

Grand mean = 0.678

CV = 19.62%

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 35 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.02412	0.00804	0.86	0.4835 ^{ns}
A	1	0.01352	0.01352	1.44	0.2475 ^{ns}
B	1	0.01058	0.01058	1.13	0.3041 ^{ns}
A*B	1	0.00002	0.00002	0.00	0.9638 ^{ns}
Error	16	0.15016	0.00938		
Total	19	0.17428			

Grand Mean = 0.714 CV = 13.56%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 36 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.00713	0.00237	0.26	0.8524 ^{ns}
A	1	0.00312	0.00312	0.34	0.5663 ^{ns}
B	1	0.00220	0.00220	0.24	0.6294 ^{ns}
A*B	1	0.00180	0.00180	0.20	0.6622 ^{ns}
Error	16	0.14576	0.00911		
Total	19	0.15289			

Grand Mean = 0.819 CV = 11.64%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 37 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.09796	0.03265	5.06	0.0118*
A	1	0.09522	0.09522	14.77	0.0014**
B	1	0.00242	0.00242	0.38	0.5487 ^{ns}
A*B	1	0.00032	0.00032	0.05	0.8265 ^{ns}
Error	16	0.10316	0.00644		
Total	19	0.20112			

Grand Mean = 1.028 CV = 7.81%

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 99%

ตารางที่ 38 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.04205	0.01401	1.49	0.2553 ^{ns}
A	1	0.04140	0.04140	4.40	0.0522 ^{ns}
B	1	0.00060	0.00060	0.06	0.8031 ^{ns}
A*B	1	0.00004	0.00004	0.00	0.9457 ^{ns}
Error	16	0.15060	0.00941		
Total	19	0.19265			

Grand Mean = 1.041 CV = 9.31%

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

ตารางที่ 39 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.09989	0.03329	1.78	0.1917
A	1	0.03784	0.03784	2.02	0.1743
B	1	0.05724	0.05724	3.06	0.0995
A*B	1	0.00480	0.00480	0.26	0.6193
Error	16	0.29956	0.01872		
Total	19	0.39945			

Grand Mean = 1.241 CV = 11.02%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

ตารางที่ 40 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 12

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.14900	0.04966	0.08	0.9717 ^{ns}
A	1	0.07938	0.07938	0.12	0.7310 ^{ns}
B	1	0.06962	0.06962	0.11	0.7474 ^{ns}
A*B	1	0.00000	0.00000	0.00	1.0000 ^{ns}
Error	16	10.3739	0.64837		
Total	19	10.52292			

Grand Mean = 1.114 CV = 34.15%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 41 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 14

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.12044	0.04014	0.05	0.9859 ^{ns}
A	1	0.07938	0.07938	0.09	0.7638 ^{ns}
B	1	0.03528	0.03528	0.04	0.8411 ^{ns}
A*B	1	0.00578	0.00578	0.01	0.9353 ^{ns}
Error	16	13.59628	0.84976		
Total	19	13.71672			

Grand Mean = 1.158 CV = 36.14%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

ตารางที่ 42 วิเคราะห์ผลขนาดแคลลัส หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 16

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	0.51916	0.17305	0.15	0.9301 ^{ns}
A	1	0.31752	0.31752	0.27	0.6106 ^{ns}
B	1	0.10082	0.10082	0.09	0.7735 ^{ns}
A*B	1	0.10082	0.10082	0.09	0.7735 ^{ns}
Error	16	18.82872	1.17679		
Total	19	19.34788			

Grand Mean = 1.172 CV = 40.47%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 43 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 2

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	184.62893	61.54297	4.61	0.0165*
A	1	108.99780	108.99780	8.17	0.0114*
B	1	55.61112	55.61112	4.17	0.0581 ^{ns}
A*B	1	20.02000	20.02000	1.50	0.2384 ^{ns}
Error	16	213.54672	13.34667		
Total	19	398.17565			

Grand Mean = 96.998 CV = 3.76%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95%

ตารางที่ 44 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	195.75116	65.25038	5.33	0.0097**
A	1	80.08002	80.08002	6.55	0.0210*
B	1	80.08002	80.08002	6.55	0.0210*
A*B	1	35.59112	35.59112	2.91	0.1074 ^{ns}
Error	16	195.75116	12.23444		
Total	19	391.50232			

Grand Mean = 97.332 CV = 3.59%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95%

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 45 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 6

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	329.12449	109.7081	2.15	0.1345 ^{ns}
A	1	8.88444	8.88444	0.17	0.6823 ^{ns}
B	1	0.00000	0.00000	0.00	0.9998 ^{ns}
A*B	1	320.24004	320.24004	6.26	0.0235*
Error	16	817.92900	51.1205		
Total	19	1147.05349			

Grand Mean = 92.664 CV = 7.71%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95%

ตารางที่ 46 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	302.12445	100.70815	0.79	0.5179 ^{ns}
A	1	79.96000	79.96000	0.63	0.4404 ^{ns}
B	1	142.20444	142.20444	1.11	0.3071 ^{ns}
A*B	1	79.96000	79.96000	0.63	0.4404 ^{ns}
Error	16	2044.16900	127.76056		
Total	19	2346.29345			

Grand Mean = 63.996 CV = 17.66%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 47 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 10

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	213.44001	71.14667	0.32	0.8118 ^{ns}
A	1	142.31112	142.31112	0.64	0.4364 ^{ns}
B	1	35.56444	35.56444	0.16	0.6951 ^{ns}
A*B	1	35.56444	35.56444	0.16	0.6951 ^{ns}
Error	16	3572.93348	223.3083		
Total	19	3786.37349			

Grand Mean = 41.330 CV = 36.15%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

ตารางที่ 48 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 12

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	44.44889	14.81629	0.04	0.9891 ^{ns}
A	1	8.88444	8.88444	0.02	0.8795 ^{ns}
B	1	8.88444	8.88444	0.02	0.8795 ^{ns}
A*B	1	35.56444	35.56444	0.09	0.7619 ^{ns}
Error	16	5989.90236	374.36889		
Total	19	6034.35125			

Grand Mean = 30.851 CV = 22.25%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 49 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 14

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	35.53778	11.84592	0.06	0.9784 ^{ns}
A	1	35.53778	35.53778	0.19	0.6684 ^{ns}
B	1	0.00000	0.00000	0.00	1.0000 ^{ns}
A*B	1	0.00000	0.00000	0.00	1.0000 ^{ns}
Error	16	2985.70680	186.60667		
Total	19	3021.24458			

Grand Mean = 26.916 CV = 16.81%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

ตารางที่ 50 วิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต หลังการถ่ายยีน บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 16

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	59.98001	19.99333	0.23	0.8736 ^{ns}
A	1	2.21112	2.21112	0.03	0.8751 ^{ns}
B	1	55.54444	55.54444	0.64	0.4351 ^{ns}
A*B	1	2.22444	2.22444	0.03	0.8747 ^{ns}
Error	16	1386.37348	86.64834		
Total	19	1446.35349			

Grand Mean = 23.252 CV = 21.86%

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 51 วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี GUS histochemical assay

Source	df	SS	MS	F Value	Pr > F
Treatment	3	4406.07201	1468.69067	57.68	<.0001**
A	1	4380.50400	4380.50400	172.03	<.0001**
B	1	12.78400	12.78400	0.50	0.4888 ^{ns}
A*B	1	12.78400	12.78400	0.50	0.4888 ^{ns}
Error	16	407.42408	25.46400		
Total	19	4813.49609			

Grand Mean = 34.799 CV = 14.50%

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 99%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววิลาสินี สิทวีทรัพย์
วัน เดือน ปีเกิด	24 มีนาคม 2527 ที่ ชัยภูมิ
ที่อยู่	141/5 หมู่ 7 ถ.ชัยภูมิ-บ้านเขว้า ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ชัยภูมิ 36000
ประวัติการศึกษา	2549 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาฟิสิกส์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้