สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาผลของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ร่วมกับการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

Study of the Effects of Sonication on *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Curcuma alismatifolia* Gagnep.

โดย

นางสาวจินตนา ศรีตะวัน

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

พุทธศักราช 2550

๒/๓๙.
๑๔๕๖๗
๒๕๕๐

เลขหมู่ 82129
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี - 8 ก.ค. 2551

b 11945978
i

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาผลของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ร่วมกับการถ่ายยีน
เข้าสู่ปทุมมาโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

Study of the Effects of Sonication on *Agrobacterium*-Mediated
Transformation in *Curcuma alismatifolia* Gagnep.

โดย

นางสาวจินตนา ศรีตะวัน

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 1 เดือน 1 พ.ศ. 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	การศึกษาผลของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ร่วมกับการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ
โดย	นางสาวจินตนา ศรีตะวัน
ภาควิชา	พืชสวน
สาขา	พืชสวน
คณะ	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การทดสอบการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 2301 เป็นพาหะ ที่มียีนต้านทาน kanamycin (*ntp*II) และยีน *gus* (ß-glucuronidase) โดยนำหน่อปทุมมาที่อยู่ในสารแขวนลอยของเชื้อ *A.tumefaciens* มาทำการ sonication เป็นเวลา, 30, 60, 90, และ 120 วินาที จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ดัดแปลง ที่เติม BA 3.0 mg/l และ TDZ 0.5 mg/l. ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 30 วินาที มีหน่อใหม่เกิดขึ้นจำนวนมากที่สุด และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS assay พบว่า การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 30 วินาที มีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนโดยมีการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study of the Effects of Sonication on *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Curcuma alismatifolia* Gagnep.
By	Miss Chintana Sritawan
Major	Horticulture
Department	Horticulture
Faculty	Agricultural Technology
Advisor	Assit. Prof. Dr. Kanjana Saetiew

ABSTRACT

The effects of sonication on *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation was tested. *Agrobacterium tumefaciens* stain EHA 105 carrying pCAMBIA 2301 plasmid contained ß-glucuronidase (*gus*) as a reporter gene and neomycin phosphotransferase (*npt*II) as a selectable marker gene. The inoculation of *A. tumefaciens* with plant tissue was sonicated 30, 60, 90, and 120 s. The explants were cultured on MS medium supplemented with 3.0 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ, 250 mg/l cefotaxine and 100 mg/l kanamycin. After 8 weeks, the explants without sonication showed highest regeneration shoot number. After GUS assay was demonstrated, it was found that the transgenic tissue showed highest performance of *gus* gene after inoculated *A. tumefaciens* with explant in 30s sonication.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรีนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เป็นการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ปรับปรุงกระบวนการทางด้านความคิด ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

การทดลองครั้งนี้ข้าพเจ้าใคร่ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว ที่กรุณาให้คำปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำ และถ่ายทอดความรู้ต่าง ๆ ตลอดทั้งตรวจทานแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ พี่ ๆ ปริญญาโท และเพื่อน ๆ ที่เป็นกำลังใจ คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษามาโดยตลอดในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

จินตนา ศรีตะวัน

มีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
สารบัญตารางภาคผนวก	ง
คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้	ฉ
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลอง	17
วิจารณ์ผลการทดลอง	25
สรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. การเตรียม stock สำหรับตรวจสอบยีน *GUS* 14
2. การเตรียมสารละลาย buffer..... 15
3. แสดงการเจริญเติบโตของปทุมมาสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. Tumafaciens* สายพันธุ์ EHA 105 pCAMBIA 2301 ร่วมกับการใช้เครื่องใช้ sonicate ในระยะเวลาต่าง ๆ..... 18
4. แสดงการเจริญเติบโตของปทุมมาสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. Tumafaciens* สายพันธุ์ EHA 105 pCAMBIA 2301 ร่วมกับการใช้เครื่อง ใช้ sonicate ในระยะเวลาต่าง ๆ..... 20
5. แสดงการเจริญเติบโตของปทุมมาสัปดาห์ที่ 8 ภายหลังการถ่ายยีนโดยใช้ *A. Tumafaciens* สายพันธุ์ EHA 105 pCAMBIA 2301 ร่วมกับการใช้เครื่อง ใช้ sonicate ในระยะเวลาต่าง ๆ..... 22
6. แสดงผลการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) โดย *A.tumefaciens* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงระยะเวลาต่าง ๆ ในหน่อของปทุมมา เมื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus*..... 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. ลักษณะการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อ *A. tumefacien* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3.0 mg/l และ TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับยาปฏิชีวนะ Cefotaxine 250 mg/l และ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 24

2. การแสดงออกของยีน *gus* บนใบและรากปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3.0 mg/l และ TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

1. สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige & Skoog (1962)..... 31
2. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อเมื่ออายุ 4 สัปดาห์..... 32
3. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์..... 32
4. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์..... 33
5. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์..... 33
6. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์..... 34
7. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์..... 34
8. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์..... 35
9. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์..... 35
10. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์..... 36
11. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์..... 36
12. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์..... 37
13. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์..... 37
14. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการ sonicate ต่อความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์..... 38
15. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์..... 38

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์..... 39
17. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติผลของการใช้ sonicate ต่อจำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้

BA	Benzylamino purine
NAA	α- Napthalene acetic acid
TDZ	phenyl-3-1,2,3-thiadiazol-5-yi urea
MS	Murashige and skoog (1962)
BAP	6-benzylamino purine
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
kinetin	6-furfurylamino purine
zeatin	6-4-hydroxy-3-meyhyl-trans-2-butenylamino purine
ppm	part per million
HgCl	Mercuric chloride
mg	มิลลิกรัม
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
ml	มิลลิลิตร
µM	ไมโครโมล
µl	ไมโครลิตร
cm.	เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปทุมมา มีลักษณะคล้ายดอกทิวลิป เรียก ทิวลิปแห่งสยาม (Tulip of Siam) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากสภาพภูมิอากาศ ของประเทศไทยเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา จึงนับได้ว่าประเทศไทยเป็นแหล่งใหญ่ที่มีการปลูกปทุมาเพื่อการส่งออกซึ่งการส่งออกปทุมมา ส่วนใหญ่จะเป็นการส่งออกในรูปหัวพันธุ์มากกว่า การส่งออกดอก เนื่องจากง่ายต่อการขนส่ง ดังนั้นเพื่อเป็นการขยายตลาดใหม่ให้สามารถส่งออกปทุมมาได้มากขึ้น และยังครองตลาดเก่าให้ได้นาน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ของปทุมมา ให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น และมีลักษณะดีตรงตามความต้องการของตลาด

เทคโนโลยีชีวภาพ เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว เช่น การศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาด้วย *Agrobacterium tumefaciens* โดยนำวิธีการ sonication มาร่วมด้วยวิธีนี้มีชื่อว่า Sonication - Assisted Agrobacterium Mediated transformation (SAAT) เพื่อสร้างต้นปทุมมาให้มีลักษณะดีตามต้องการ ทนทานต่อโรค และแมลงศัตรูพืช ในการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมานั้น จำเป็นที่จะต้องมีความรู้พื้นฐาน ในการส่งถ่ายยีนก่อน การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการส่งถ่ายยีนสู่ปทุมมาโดยอาศัย *A.tumefaeien* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียง(sonication) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการส่งถ่ายยีนต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการใช้คลื่นเสียง (sonicate) ร่วมกับการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 2301

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ปทุมมา (Siam Tulip)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma alismatifolia* Gagnap.

Kingdom : Plantae

Phylum : Mangnoliophyta

Class : Liliopsida

Order : Zingiberales

Family : Zingiberaceae

Genus : Curcuma

Species : alismatifolia

ปทุมมา จัดเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับขิงและข่า อยู่ในสกุล Curcuma มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศอินโดจีน พม่า และไทย สำหรับในประเทศไทยจะพบเห็นปทุมมาได้แทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากที่สุด ปทุมมาเป็นไม้ดอกเมืองร้อน ที่มีมูลค่าการส่งออกประมาณ 15-30 ล้านบาทต่อปี โดยประเทศไทยส่งออกปทุมมาในรูปของหัวพันธุ์ไปยังต่างประเทศ ซึ่งชาวต่างประเทศโดยเฉพาะเนเธอร์แลนด์ จะรู้จักปทุมมาเป็นอย่างดีจนกระทั่ง มีการขนานนามความสวยงามของดอกปทุมมา ซึ่งมีลักษณะคล้ายดอกทิวลิป เรียกว่า สยามทิวลิป (Siam of Tulip) พืชสกุลนี้หลายชนิดมีดอกสวยงาม ได้ถูกพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับและตกแต่งสถานที่ เพื่อการส่งออกจึงได้สนับสนุนพันธุ์พืชชนิดต่างๆ ในสกุลขมิ้นหลายชนิด ที่มีศักยภาพเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เพื่อเป็นสินค้าเกษตรส่งออก ได้แก่ ปทุมมา *(Curcuma alismatifolia* Gagnep*)* กระเจียวส้ม *(C.noscocna*"Orange"*)* บัวชั้น *(C.roscoena*"Pink"*)* บัวลาย *(C.parviflora*"violet"*)* เทพรำลึก *(C.parviflora*"White Angle"*)* และ เทพอัปสร (บัวขาว) (*C. thorelii Gegnep*"Chiangmai Snow"*)* แต่ในปัจจุบันสายพันธุ์ที่สามารถส่งออกได้ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ปทุมมา (อรวรรณ, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น พืชในสกุลนี้มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้า (Rhizome) ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหารและมีลำต้นเทียม (pseudostem) ซึ่งเกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบ ลำต้นเทียมนี้เกิดจากตาข้างของเหง้า

ใบ เป็นใบเดี่ยวอาจเป็นรูปหอกหรือรูปไข่ โดยอาจเห็นเส้นใบได้ชัดเจนในชนิดที่ใบเป็นคลื่น

ราก รากเป็นระบบรากฝอยโดยมีรากจำนวนหนึ่งสะสมอาหาร ใกล้ปลายรากทำให้รากบวมเป็นตุ้มขนาดใหญ่สีขาวซึ่งบางคนเรียก milk stalk

ดอก ช่อดอกจะเกิดโดยตรงจากดอกที่ปลายยอดของลำต้นเทียม ดอกเป็นแบบช่อแน่น (compact spike) ประกอบด้วย กลีบของใบประดับ (bract) จะเวียนซ้อนกันเกิดเป็นช่อทรงกระบอก โดยอาจเวียนแบบตามหรือทวนเข็มนาฬิกาก็ได้ ทั้งนี้โคนใบประดับจะเชื่อมกันเกิดเป็นถ้วยขึ้น ใบประดับอาจมีสีเขียวทั้งช่อ หรืออาจมีสีเขียวเฉพาะส่วนล่างของช่อ และมีสีอื่นในส่วนบนของช่อ หรืออาจมีสีอื่นทั้งช่อต่างกันไปตามชนิดและพันธุ์ สำหรับใบประดับส่วนบนของช่อนั้น มักจะยาวกว่าใบประดับส่วนล่างเล็กน้อย และไม่มีดอกจริงที่ซอกใบประดับเหมือนกับใบประดับส่วนล่างของช่อ ใบประดับส่วนบนนี้จึงถูกเรียกชื่อว่า coma bract หรือ ใบประดับชนิด coma ดอกจะเริ่มบานราว 6 นาฬิกา หรือช่วงที่ต้นพืชได้รับแสงแดดในตอนเช้า และพร้อมที่จะรับการถ่ายละอองเกสรในเวลา 8 - 10 นาฬิกา เป็นส่วนใหญ่ มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ดอกบานในช่วงบ่ายและพร้อมที่จะรับการถ่ายละอองเกสรในเวลาราว 16 นาฬิกา

ผลและเมล็ด ปกติดอกในแต่ละซอกของใบประดับ จะพัฒนาเป็นผลที่สมบูรณ์ได้เพียง 2 ผล เนื่องจากผลที่สมบูรณ์จะมีขนาดใหญ่เกือบเต็มถ้วย ซึ่งเกิดจากการเชื่อมกันของใบประดับ ทำให้ผลสามารถเบียดกันอยู่ได้เพียง 2 ผล ผลมีทรงกลมขนาดต่างกันขึ้นกับชนิดและความสมบูรณ์ผล มี 3 ช่อง ภายในมีเมล็ดรูปร่างและขนาดคล้ายเมล็ดองุ่น ด้านปลายแหลมของเมล็ดมีเยื่อบางสีขาวมีลักษณะเป็นแฉกหลายแฉกติดอยู่ เมล็ดมักมีการพักตัวเหมือนกับการพักตัวของเหง้า

การเจริญเติบโตของปทุมมานั้น มีช่วงจำกัดโดยจะเจริญในช่วงฤดูฝนสามารถให้ดอกสวยงามตั้งแต่ปลายเดือนกันยายน ช่วงอากาศแห้งแล้งและช่วงวันสั้นจะเกิดการพักตัวของหัวพันธุ์ และจะเริ่มเจริญเติบโตได้ใหม่อีกประมาณเดือนเมษายน

การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์พืชในวงศ์ขิงเกิดอย่างจำกัด เนื่องจากพืชในวงศ์นี้ไม่ค่อยออกดอกและติดเมล็ด ทำให้การขยายพันธุ์เกิดได้ในปริมาณไม่มาก แม้ว่าจะมีการขยายพันธุ์ด้วยการแยกหัว ซึ่งการแยกหัวเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมแต่การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ทำได้ปีละ 1 ครั้ง ในช่วงต้นฤดูฝน ส่วนวิธีการที่มีการผ่าเหง้ากึ่งกลางตาที่มีอยู่สองข้าง จะทำให้ได้หัวพันธุ์ที่มีอาหารสะสมน้อยกว่าปกติ ทำให้งอกช้าและ ช่อดอกมีคุณภาพต่ำส่งผลให้การส่งออกชะลอตัว จึงได้มีการนำเทคนิคทางด้าน

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ สามารถชักนำให้เกิดต้นในสภาพปลอดเชื้อ จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งสามารถพัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดท่อนพันธุ์ปทุมมาขนาดเล็ก โดยวิธีการนี้จะสามารถผลิตท่อนพันธุ์ปทุมมาปลอดโรคได้ในปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้น ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชวงศ์ขิง สามารถชักนำให้เกิดต้นด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำตาจากเหง้าในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 2 mg/l และน้ำตาลซูโครส 20 g/l นาน 4 สัปดาห์ สามารถชักนำจากเหง้าเกิดต้นได้ โดยตาเหง้า 1 ตาเกิดต้นหรือลำต้นเทียมในปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับการนำตาของเหง้าข่า *(Alpinia galanga)* เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอด โดยชิ้นส่วนตั้งต้น 1 ตา จะเกิดยอด 8 ยอด และพัฒนาต่อไปเป็นต้น (Borthakur *et al*., 1999)

การส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในดินแกรมลบ จัดอยู่ในวงศ์ Rhizobiaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) มีขนาด1.0 -0.6 μm x 1.5-3.0 μm หายใจแบบใช้ออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ (non-sporeforming) เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) 1-6 แฟลกเจลลา โดยธรรมชาติ *Agrobacterium* ก่อให้เกิดโรคพืช *Agrobacterium* ที่สำคัญมี 2 สปีชีส์ ได้แก่ *A. tumefaciens* ก่อให้เกิดโรค cown gall และ *A. rhizogenes* ก่อให้เกิดโรค hairy root การนำ ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชโดยอาศัย *A. tumefaciens* เป็นตัวกลาง เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลดี ทำได้สะดวกและใช้เวลาสั้น จึงนิยมใช้วิธีนี้อย่างกว้างขวาง *A. tumefaciens* มีพลาสมิดขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เรียกว่า Ti plasmid (tumor inducing plasmid) ซึ่งมีขนาด 150-200 kb เมื่อพืชเกิดบาดแผล จะปล่อยสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ออกมา แบคทีเรียจะเคลื่อนที่เข้าหาบาดแผลของพืชด้วยกลไก chemotaxis เมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับพืชบริเวณที่มีบาดแผลแล้วจะเกิดการกระตุ้น ให้แบคทีเรียส่ง T-DNA ที่อยู่ใน Ti plasmid เข้าไปในเซลล์ของพืช ซึ่งจะแทรกตัวเข้าไปอยู่กับโครโมโซมพืช โดยอาศัย *vir* gene ที่อยู่บน Ti ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสร้างสารที่จำเป็นต่อการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืช แล้วใช้กลไกของพืชในการแปลรหัสดีเอ็นเอ สร้างโปรตีนจาก T-DNA เพื่อให้ *Agrobacterium* ใช้เป็นแหล่งพลังงานต่อไป ในธรรมชาติ T-DNA ประกอบด้วยยีนหลายชนิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เกี่ยวกับ การผลิตฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโทไคนิน และสร้างสารประกอบพวกโอปีน (opines) ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ กรดอะมิโน และน้ำตาล ซึ่ง *Agrobacterium* นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตสารโอปีนที่พบได้แก่ ออกโทปีน (octopine) โนปาลีน (nopaline) ลิวซิโนปีน (leucinopine) และซักซินาโมปีน (succinamopine) (Novak, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากคุณสมบัติ Ti plasmid ในการส่งถ่ายส่วนของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช Ti plasmid จึงถูกนำมาใช้เป็นพาหะนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่พืช โดยกำจัดยีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน ที่ทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวและเจริญเติบโตแบบผิดปกติออกไป แล้วแทนที่ด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด (multiple cloning site) และควบคุมลักษณะที่ต้องการบนส่วนของ T-DNA ระหว่าง left border และ right border ของ T-DNA แล้วให้ *Agrobacterium* ทำการส่งถ่าย T-DNA เพื่อเข้าสู่เซลล์และเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช เพื่อให้เกิดการแสดงออกในลักษณะที่ต้องการ พืชที่ได้รับดีเอ็นเอจะสามารถเจริญเติบโตเป็นพืชที่มีลักษณะปกติ ซึ่งสามารถคัดเลือกได้จากยีนที่ใส่เข้าไป ยีนลูกผสมประกอบด้วย โปรโมเตอร์สำหรับพืชและยีนต้านทานของแบคทีเรีย สามารถนำมาใช้เป็นตัวคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับดีเอ็นเอเข้าไปในโครโมโซม เนื่องจากปกติเซลล์พืชจะไม่สามารถแบ่งตัวในอาหารที่มียาปฏิชีวนะผสมอยู่ แต่เซลล์พืชที่ได้รับดีเอ็นเอ ซึ่งส่วนของยีนต้านทานจะสามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงสามารถแยกเซลล์พืชที่ได้รับดีเอ็นเอ เข้าไปในโครโมโซมออกจากเซลล์พืชธรรมดาที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอ ยีนต้านทานส่วนใหญ่ที่ใช้ ได้แก่ ยีนต้านทานกานามัยซิน (km^R) และ ยีนต้านทานโกรมัยซิน (Hyr^R) (วราพงษ์, 2550)

ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium*

ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium* ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆได้แก่ การเลือกใช้เนื้อเยื่อเป้าหมายที่มีการตอบสนองต่อการส่งถ่ายยีนสูง การปรับสภาวะของการส่งถ่ายยีนให้เหมาะสมต่อการบุกรุกของ *Agrobacterium* เช่น การเติมสารประกอบฟีนอล เช่นเดียวกับสารที่เซลล์พืชปล่อยออกมาขณะเกิดบาดแผล การใช้ยีนควบคุมการแสดงออกที่มีประสิทธิภาพกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวมถึงการเลือกใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ที่เหมาะสม การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชโดยอาศัย *A.tumefaciens* ทำได้โดยใช้โพรโทพลาสต์ (protoplast) หรือใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืช (explant inoculation) โดยพืชจะถูกเลี้ยงกับแบคทีเรียในเวลาสั้น ๆ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่กระตุ้นให้เกิดแคลลัส จากนั้นจึงชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นในอาหารที่เหมาะสม (วัฒนาลัย และ สรวง, 2536) ประกอบที่มี pH ประมาณ 5.0 - 5.8 และมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น phenolic compound ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ lignin และ Flavonoid สาร phenolic compound ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *vir* ได้แก่ acetosyringone และ alpha-hydroxyacetosyringone ซึ่งพบมากในเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผล (Stachel *et al.*, 1985) มีรายงานการศึกษาถึงผลของสารเคมี acetosyringone ซึ่งเป็นสารที่หลั่งจากบาดแผลของพืชเป็นเวลา 8-16 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ที่อยู่บน Ti plasmid ได้ทำให้มีการสร้างเอนไซม์ endonuclease ออกมาตัดชิ้นส่วน T–DNA เพื่อเข้าไปเชื่อมต่อกับโครโมโซมของเซลล์พืช (Hooykass *et al.*, 1984)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการทำให้เกิดบาดแผล

1. การตัดใช้กับเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ พื้นผิวเรียบ เช่น บริเวณข้อของใบเลี้ยง หรือส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญอื่น ๆ

2. Sonicator ใช้กับเนื้อเยื่อส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญเล็กใบเลี้ยงอ่อนและ multiple shoots หลักการคือ คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงจะทำให้เนื้อเยื่อที่ผิวปลิแตก ทั่วทั้งผิวเนื้อเยื่อ ทำให้เชื้อสามารถเข้า infect ได้ง่าย ส่วนระยะเวลาในการใช้คลื่นเสียงจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิด และขนาดของเนื้อเยื่อ กำลังและรุ่นของเครื่อง sonicator ดังนั้นจึงต้องทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมก่อนการใช้จริง

3. Silicon carbide ส่วนเนื้อเยื่อที่เหมาะสมควรเป็นเนื้อเยื่อที่มีซอกมุมน้อย มีขนาดเล็ก เช่น somatic หรือ zygotic embryo เซลล์และเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด

4. Bombard with particle ยิงด้วยอนุภาค เปล่า ๆ การทำบาดแผลทุกวิธีจะได้ผลดีเมื่อทำร่วมกับการ vacuum ซึ่งจะทำให้เชื้อแบคทีเรีย เข้าถึงบริเวณบาดแผลได้มากขึ้น

ยีนรายงานผล (Reporter gene)

เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการ เพื่อตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์ ว่ามีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อ มากน้อยเพียงใด ซึ่งยีนรายงานผลจะควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ส่งผลต่อยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปให้มีการแสดงออก ยีนรายงานผลนิยมใช้ในการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปมากกว่าที่จะใช้ในขั้นตอนการคัดเลือก transformanted ตัวอย่างยีนรายงานผลที่นิยมใช้ในการศึกษาคือ *gus* (*β*-glucuronidase), *cat* (cloramphenical acetyltransferase), *luc* (firefly luciferase), *nos* (nopaline synthase) และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ anthocyanin (Jefferson *et al*., 1987) สามารถโคลนยีน *gus* (*β*-glucuronidase) จากแบคทีเรีย *E. coli* โดยนำมาประยุกต์ใช้เป็นยีนรายงานผลในพืชชั้นสูงได้สำเร็จ ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ยีน *gus* กำหนดการสร้างเอนไซม์ *gus* (*β*-glucuronidase) ซึ่งทำหน้าที่ คะตะไลต์ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ 5-bromo-4-chloro-3-indole-*β*-D-glucuronidase ให้เป็นสารอินโดลลิล (indolyl derivative) มีสีฟ้าของ 5- bromo- 4-chloro-indico ดังสมการ

5- bromo- 4-chloro -3- indole- *β*-D glucuronidase ⟶ 5- bromo- 4-chloro-indico

มีรายงานว่ายีนรายงานผลที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่งนอกจาก *gus* gene คือ ยีนที่ควบคุมการสร้าง Green Fluorescent Protein (GFP) จากแมงกะพรุน (jelly fish) ซึ่งถูกดัดแปลงให้มีความเหมาะสมในการเป็นยีนรายงานผลที่แสดงออกภายในต้นพืชเอง (*in vivo*) โดยเมื่อพืชได้รับแสงสีน้ำเงิน (blue light GFP gene) จะแสดงออกเป็น bright - gene fluorescent ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าง่ายต่อการตรวจสอบ และได้ผลเร็ว (Christou, 1996) นอกจากนี้ยังได้มีการทำการส่งถ่ายยีนเข้า Oat seed ด้วยวิธี Microprojectile bombardment ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบัน แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีข้อจำกัดเรื่องจำนวนชุดของยีน (Copy number) ที่เข้าไป ซึ่งอาจมีหลายยีนทำให้มีปัญหาเรื่องการกดดันการแสดงออกของยีน (gene silencing) ได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งประสบความสำเร็จมากกกว่า เพราะยีนเข้าไปโดย มีจำนวนชุดยีนน้อยทำให้ไม่ไปรบกวนระบบต่างๆ ภายในเซลล์มากนัก (Hansen and Wright, 1999)

ยีนเครื่องหมาย (Selectable Marker Gene)

ยีนเครื่องหมาย เป็นยีนที่กำหนดลักษณะบางประการเพื่อใช้ในการคัดเลือกเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งขั้นตอนการคัดเลือกมีความสำคัญมากในกระบวนการส่งถ่ายยีนสู่พืช เพราะใช้ในการแยกเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน ออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีน ยีนเครื่องหมายที่ใช้มักเป็นยีนที่ต้านทานสารเคมีบางอย่า เช่น ยีนที่กำหนดลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance) ทำให้สามารถแยกเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ ออกจากยีนที่ไม่ต้านทานยาปฏิชีวนะได้ เพราะยาปฏิชีวนะจะมีผลยับยั้งกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์พืช (Hansen and Wright, 1999)

ลักษณะจำเพาะของยีนเครื่องหมาย มีดังนี้

1. สามารถแยกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีนออกจาก transform cell ได้เป็นอย่างดี ถึงแม้จะมี non- transform cell จำนวนน้อยก็ตาม
2. สามารถคัดเลือก transform cell ได้เป็นจำนวนมาก โดยไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการ regencration
3. สามารถประยุกต์ใช้ได้กับพืชหลายชนิด
4. ต้องผ่านการทดสอบเพื่อยืนยันการแสดงออกของยีนเครื่องหมายนั้น ๆ

ยีนเครื่องหมายส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ศึกษา มักเป็นยีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ ในกลุ่ม amino glycoside เช่น ยีน *npt* II ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินและเจนตามัยซิน โดยควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ neomycinphosphotransferase II (*nptII)* มีผลยับยั้งการทำงานของยาปฏิชีวนะ kanamycin นอกจากเครื่องหมายที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแล้วยังมียีนที่กำหนดลักษณะอื่น ๆ ที่ใช้คัดเลือก transformanted เช่น ยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (Herbicide-resistance Marker) หรือยีนกำหนดการสร้างสารเคมีเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เช่น MIP marker (Mannose-6-Phosphate isomerase gene) หรือ *man A gene* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ Mannose-6-Phosphate isomerase ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เปลี่ยน man - 6P ให้เป็น fructose - 6P หาก transformanted มี *man A gene* ก็จะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มี mannose นิยมใช้ MIP marker มาศึกษาในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวโพดและข้าวสาลี (Hansen and Wright, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens*

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* จำเป็นต้องมีการศึกษาอิทธิพลของยาปฏิชีวนะที่มีต่อพืช เนื่องจากยีนต้านทานยาปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก ซึ่งมีหน้าที่ในการช่วยคัดเลือกพืช ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนในระยะแรก เพื่อให้เซลล์พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นขึ้นมาได้ ภายใต้สภาวะที่แตกต่างไปจากสภาวะปกติ ในขณะที่เซลล์พืชที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนเข้าไป ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะนั้น การส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้นเป็นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชแต่ละเซลล์ ที่อยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการคัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน หรือได้รับสารพันธุกรรมนั้น จะเริ่มต้นกันตั้งแต่ระดับเซลล์ เซลล์ใดที่ได้รับการส่งถ่ายยีนอย่างครบถ้วนจะถูกคัดเลือกไว้ และได้รับการเลี้ยงดูอย่างเหมาะสม จนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งการคัดเลือกเซลล์พืชดังกล่าวนี้จะอาศัยลักษณะการแสดงออก โดยการควบคุมของยีนเครื่องหมายคัดเลือกเป็นตัวบ่งชี้ (บุญญานาค, 2545)

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

cefotaxine เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporin group) มีสมบัติในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียรูปแท่ง (rod – shaped) แกรมลบ (gram negative) ในการจำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ด้วยยาปฏิชีวนะ cefotaxine ต้องคำนึงถึงระดับความเข้มข้นที่ใช้ เนื่องจาก cefotaxine ที่มีความเข้มข้นสูงจะสามารถกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ได้หมด แต่อาจส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ transformaned ได้ จึงได้ทำการทดสอบอิทธิพลของยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญเติบโตของพืช เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของ cefotaxine ที่เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญได้ (ประวีณา, 2544)

การใช้คลื่นเสียง sonication

ในปัจจุบันมีการใช้คลื่นเสียง (sonication) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* ในพืชหลายชนิด การถ่ายยีนร่วมกับการ sonication (Sonication-assisted Agrobacterium - mediated transformation ; SAAT) ทำได้โดยการนำเนื้อเยื่อเป้าหมายที่อยู่ใน สารแขวนลอยของเชื้อ *Agrobacterium* มาแช่ใน sonication bat ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยเทคนิค SAAT ได้แก่ ระยะเวลาของการ sonication เนื้อเยื่อเป้าหมายร่วมกับ *Agrobacterium* มีการศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค SAAT ในมะละกอ โดยนำเอ็มบริโอมะละกอมาแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อ *Agrobacterium* แล้วทำการ sonication เป็นเวลา 1, 20, 40,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 80 วินาที จากนั้นตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay พบว่า การใช้เทคนิค SAAT ในการถ่ายยีนให้กับ เอ็มบริโอของมะละกอช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้ โดยระยะเวลาของการ sonication เอ็มบริโอมะละกอร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* เป็นเวลา 80 วินาที ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนดีที่สุด ข้อมูลพื้นฐานที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค SAAT เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนให้กับเอ็มบริโอมะละกอ และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถ่ายยีนต้านทานโรคให้กับมะละกอเพื่อสร้างมะละกอต้านทานโรคต่อไปได้ (วิจิตรา และคณะ, 2546) และมีงานวิจัยกล่าวถึงการใช้ sonication เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและมีราคาถูก เทคนิค SAAT เป็นการทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดบาดแผลเล็ก ๆ จำนวนมาก ทำให้ *Agrobacterium* เคลื่อนที่เข้าไปในเนื้อเยื่อได้มากและลึกยิ่งขึ้น การส่งถ่ายยีนก็เกิดได้มากยิ่งขึ้น และสามารถใช้กับเนื้อเยื่อพืชชนิดอื่นๆได้ รวมทั้งมีการศึกษาประสบผลสำเร็จในการส่งถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค SAAT กับใบเลี้ยงของถั่วเหลือง โดยใช้เครื่อง Sonication bath รุ่น Fisher brand FS5 ระยะเวลาในการ sonication 0.2-0.5 นาที แต่ไม่เกิน 1 นาที ความหนาแน่นของ สารละลายเชื้อ *Agrobacterium* โดยนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0-2.0 อุณหภูมิที่ใช้ 27 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อร่วมกับเนื้อเยื่อในอาหารเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ผลโดยวิธี GUS assay (Trick and Finger, 1997)

รายงานงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกศสุดนธ์ (2549) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้สกุลช้างโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า ในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้ช้างกระ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *npt*II เป็นยีนคัดเลือก ตรวจสอบประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมเท่ากับ 1.6 x10^8cfu/ml ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโปรโตคอร์มกล้วยไม้ร่วมกับสารแขวนลอยของ *A.tumefacien* คือ 30 นาทีการเตรียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้ก่อนส่งถ่ายยีนด้วยการนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี cystein 400 mg/l เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมาส่งถ่ายยีน พบว่า ไม่มีผลส่งเสริมประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน ในขณะที่การให้คลื่นความถี่ของเสียงเป็นเวลา 15 วินาที 2 ครั้ง ในระหว่างการแช่ชิ้นส่วนพืชในสารแขวนลอยของเชื้อ *A. tumefaciens* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้ช้างกระมากกว่าชุดควบคุม

บุษกร (2548) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่โพรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงิน และมิสสิงคโปร์ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธ์ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มียีน *antisense ACC oxidase* ยีนต้านทานไฮโกรมัยซิน *(hpt)* และยีน *gus* (*β*-glucuronidase) พบว่า สามารถส่งถ่ายยีนสู่โปรโตคอร์มได้โดยมีเปอร์เซ็นการต้านทานต่อไฮโกรมัยซินเท่ากับ 2.17% และ 8.15% ตามลำดับ ส่วนการส่งถ่ายยีนโดยใช้ microprojectile bombardment โดยการใช้พลาสมิดเคลือบบนอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทองคำขนาด 1.1 µM แรงดันก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว พบว่า การส่งถ่ายยีนโดยใช้อนุภาคทองคำ มีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีนสูงกว่าการใช้อนุภาคทังสเตน เมื่อตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วย GUS assay พบว่าโพรโทคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกของยีน *gus* และเมื่อตรวจสอบการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยีนที่ส่งเข้าไปสอดแทรกในจีโนมของกล้วยไม้ทั้งสองชนิด

ปรียา และคณะ (2545) ทำการวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Curcuma 8 ชนิด เพื่อเพิ่มจำนวนหรือเพื่อสร้างแคลลัสภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยศึกษาผลของฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, TDZ และ kinetin และกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA และ 2,4-D พบว่าที่ความเข้มข้น BA 3 และ 7 mg/l ฮอร์โมน TDZ เข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ยจำนวนสูงสุด นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นในอาหารเหลว ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถอยู่รอดได้เมื่อปลูกในธรรมชาติ การใช้เทคนิค RAPD เพื่อประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุลนี้ เมื่อใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 61 ไพเมอร์พบว่า 31 ไพเมอร์ ให้แถบ DNA ที่นำไปใช้ช่วยในการจำแนกสกุลและชนิดได้

วริศา (2548) การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase เข้าสู่โพรโทคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) และ microprojestile bombardment ที่มียีน *hpt* II และยีน *gus* พบว่า โพรโทคอร์มเข็มขาว และเอื้องคำ ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* มีเปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อ hygromycin เท่ากับ 54% และ 23% ตามลำดับ สำหรับโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ที่ทำการส่งถ่ายยีนโดยใช้ microprojestile bombardment มีเปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อ hygromycin เท่ากับ 42% และ21% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วย GUS assay พบว่า มีกิจกรรมของยีน *gus* และเมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค PCR พบว่า มีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป

สินีธร (2544) ได้ศึกษาการผลิตต้นประทุมมาที่มีคุณภาพในสภาพหลอดแก้ว โดยใช้ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ BA (Benzyladenine) TDZ (Thidiazuron) อย่างละความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 mg/l และสารกำจัดเชื้อรา IMA (Imazalil) ความเข้มข้น 0,2 และ 4.0 mg/l พบว่า TDZ ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้มากกว่า BA และเมื่อใช้สารนี้ร่วมกับสาร IMA ยิ่งทำให้เกิด ต้นใหม่มีจำนวนสูงมากขึ้น นอกจากนี้ต้นใหม่ที่เกิดจากผลของ TDZ ทำให้มีลักษณะต้นแตกต่างจากต้นปกติ คือ เกิดต้นเตี้ยคล้ายยอด (retarded shoot) จำนวนมาก ซึ่งยอดเหล่านี้สามารถพัฒนากลับมาเป็นต้นสมบูรณ์เมื่อย้ายลงอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 0.3 mg/l ร่วมกับ IAA (Indole – acetic acid) ความเข้มข้น 0.1 mg/l

สุภาภรณ์ และคณะ (2545) ได้ศึกษาการชักนำ ให้เกิด hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง โดยการ infect ด้วยเชื้อ *A. rhizogenes* สายพันธุ์ K 599 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YEB เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสแล้วนำมา infect โดยทำบาด แผลที่ลำต้น 2 วิธี คือ การใช้เข็ม

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉีดยาแทงให้เกิดบาดแผล 20 แผลต่อต้น และการกรีดลำต้นตามแนวยาว 1 เซนติเมตร 3 แนวต่อต้น แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 วันจากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม cefotaxine 1.0 g/l นาน 4 สัปดาห์ เพื่อกำจัดเชื้อ *A. rhizogenes* พบว่าการชักนำให้เกิด hairy root ทั้ง 2 วิธีมีการเกิด hairy root เฉลี่ย 55% และ 45% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จากการสังเกตพบว่าการกรีดจะทำให้ปริมาณ hairy root ต่อต้นมากกว่าการแทงด้วยเข็ม

อาภัสรา (2549) ได้ทำการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนของหน่อ เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA ที่มีผลต่อการพัฒนาของปทุมมา โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA (α-Naphthaene acetic acid) และ BA (6–Benzylamino purine) ที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน คือ 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 mg/l พบว่า NAA และ BA ในทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ 3.0 mg/l. มีผลทำให้ชิ้นส่วนเจริญเติบโตเป็นต้น และเกิดจำนวนรากมากที่สุดในขณะที่เลี้ยงบนอาหารสูตรของ MS ที่เติม BA ระดับความเข้มข้นที่ 3.0 mg/l ทำให้ชิ้นส่วนเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์และมีการแตกหน่อมากที่สุด

Weber *et al.* (2002) ได้พัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในดอกทานตะวัน โดยใช้เชื้อ *Agro - bacterium* จะประเมินจากเอนไซม์ที่ใช้แช่และระยะเวลาการ sonication แล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่า ทรีทเมนต์ที่มี macerozyme R10 จะให้ผลเป็นลบ ในขณะที่มีการรวมกันของ cellulose (0.1%) และ pectinase (0.05%) อัตราหน่อของชิ้นส่วนพืช จะเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดที่ 2 เท่า ซึ่งการแสดงออกของ ยีน *gus* จะสม่ำเสมอเป็นบวก ส่วนผลการใช้ sonication (50MHz; 2, 4 และ 6 วินาที) จะเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ชิ้นส่วนพืชชั่วคราว ทรีทเมนต์ที่มีเอนไซม์เดี่ยว ๆ cellulase (0.1%) และ pectinase (0.05%) จะได้ผลดีกว่า ทรีทเมนต์ที่มีการรวมเอนไซม์กับการ sonication ในเรื่องการคงอยู่ของยีน

Zaochang *et al.* (2005) ทำการศึกษาการส่งถ่าย lea gene เขาสู่ถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) โดยใช้ *Agrobacterium* ผ่านทางวิธีการ sonication และ vacuum infiltration พบว่า การบ่มเชื้อ *Agrobacterium* ร่วมกับการ sonication 5 นาที และใช้ vacuum infiltration 5 นาที เหมาะที่สุดที่จะทำให้ การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูง ต้นถั่วที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีความสามารถเจริญเติบโตได้สภาพความเครียดที่เกิดจากปริมาณเกลือและน้ำ

Mahadtanapuk *et al.* (2006) ทำการถ่ายยีนโดยใช้ tretarded shoot เลี้ยงร่วมกับ *Agro-bacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มี pCAmBIA 121 เป็นเวลา 30 วินาที นำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหาร MS ในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำชิ้นส่วนไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l, IMA 4 mg/l, TDZ 0.5 mg/l ร่วมด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin 50 mg/l และ vancomycin 500 mg/l เมื่อครบ 4 สัปดาห์ นำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ kanamycin 50 mg/l ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เมื่อตรวจสอบผลกรส่งถ่ายยีนด้วย GUS assay พบว่ามีกิจกรรมของยีน *gus* และเมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค PCR พบว่า มีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปได้ 14 เปอร์เซ็นต์

Darshna *et al.* (2007) ทำการศึกษาการส่งถ่ายยีนที่มีความถี่สูงเข้าสู่ถั่วอินเดีย (*Vigna unguiculata* L. Walp.) โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 2301 ที่มียีน *β*-glucuronidase(*uidA)* และยีนต้านทาน neomycin phosphotransferase (*nptII)* บ่มร่วมกับส่วนของ cotyledonary node ที่ตัดมาจากเมล็ดถั่วอายุ 4 วัน นำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม MBM และ BAP (10 μM) จากนั้นชักนำให้เกิดหน่อและรากบนอาหาร MS สังเคราะห์ที่เติม IBA 2.5 μM และ kanamycin 10 mg/l เมื่อตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วย GUS assay พบว่าต้นถั่วมีการแสดงออกของยีน *gus* และเมื่อเพาะเลี้ยงต้นถั่วไปจนครบ 20-23 สัปดาห์ จึงได้นำต้นถั่ว มาทำการตรวจ สอบการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิค PCR พบว่ายีนที่ส่งถ่ายสามารถเข้าไปสอดแทรกในลูก T_1 เท่ากับ 0.76 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์และพืชที่ใช้ในการศึกษา
   - 1.1 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 2301
   - 1.2 หน่อปทุมมา
   - 1.3 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
   - 1.4 TDZ (Thidiazuron)
   - 1.5 BA (Benzyladenine)
   - 1.6 MS (Murashige & Skoog, 1962)
2. สารเคมีและน้ำยาทดสอบ (reagent)
   - 2.1 สารละลาย X-gluc (X-gluc assay buffer)
   - 2.2 kanamycin
   - 2.3 cefotaxime
   - 2.4 acetosyringone
   - 2.5 คลอรอกซ์
   - 2.6 Triton-X 100 (tween 20)
   - 2.7 70% ethanol

3 เครื่องมือ

- 3.1 เครื่องชั่งสาร
- 3.2 เครื่องวัด pH
- 3.3 เครื่อง Sonication bath รุ่น 460H 2.75L
- 3.4 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 3.5 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- 3.6 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Larminar air-flow cabinet)
- 3.7 เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ จานเพาะเลี้ยง ขวดรูปชมพู่ ปิเปต
- 3.8 ปากคีบ และมีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อพืช
- 3.9 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.11 หลอด centrifuge
- 3.12 Appendrop
- 3.13 ขวดจิ๋ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Completly Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ทรีทต์เมนท์ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัวอย่าง

1. การเตรียมชิ้นส่วนของปทุมมา

นำหน่อปทุมมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาลอกเอาส่วนของกาบใบออก ให้เหลือเฉพาะหน่อที่อยู่บนโคนต้น แล้วตัดให้หน่อมีขนาด 0.5 cm.

2. การถ่ายยีน

2.1 การปลูกเชื้อ (inoclulation) นำชิ้นส่วนปทุมมาที่เตรียมไว้แล้ว มาใส่ในขวดอาหารขนาดกลาง ที่เติมสารแขวนลอยของเชื้อ *Agrobacterium* 1.0 ml.

2.2 นำขวดอาหารมาวางลงตรงกลางเครื่อง sonicator แล้วเปิดเครื่องเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที ตามลำดับ

2.3 ย้ายชิ้นส่วนปทุมมาที่ทำการถ่ายยีน ลงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 mg/l TDZ 0.5 mg/l และเติม acetosyringone 100 μM นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 Lux ให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน

2.4 เมื่อครบ 3 วัน นำเอาชิ้นส่วนของปทุมมา มาล้างเชื้อ *Agrobacterium* ออกในอาหารเหลว MS ที่เติม cefotaxime 500 mg/l จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

2.5 ย้ายชิ้นส่วนปทุมมา มาเลี้ยงในอาหารคัดเลือก ที่เติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 100 mg/l นำไปเลี้ยงในเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.6 สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนทุก ๆ สัปดาห์ และทำการบันทึกผลการทดลองแล้ว ทำการสุ่มตัวอย่างโดยการตัดใบของปทุมมา มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี GUS assay

3. ขั้นตอนการตรวจยีน *GUS*

3.1 เตรียม stock

ตารางที่ 1 การเตรียม stock

สาร	ปริมาตร (ml)	ชั่งสาร(g)
0.1 M $Na_2HPO_4.H_2O$ (pH 7.0)	100	13.799
0.1M potassium ferricyanide	10	3.2925
20 mM potassium ferricyanide	50	4.2239
0.2 M Na_2EDTA	10	3.7224

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เตรียมสารละลาย buffer

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลาย buffer

สาร	ปริมาตรดูดจาก stock (ml)
H_2O	8.4
50 mM $NaPO_4$	10
0.5 mM potassium ferricyanide	0.1
0.5 mM potassium ferricyanide	0.5
10 mM Na_2EDTA	1.0
total	20

3.3 เตรียม X-gluc substrate โดยชั่งสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D glucuronidase จำนวน 5 mg/l ละลายใน dimethyylformamide 50 µl เตรียมใหม่ทุกครั้งหรือเก็บ stock ไว้ที่ -20° องศาเซลเซียส

3.4 เติม X-gluc substrate ที่ได้จากข้อ 3 ลงในสารละลาย buffer ในข้อ 2 ปริมาตร 8 ml.

3.5 เติม triton-X 100 (tween 20) ปริมาตร 2 µl ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ เก็บไว้ในที่มืดบนน้ำแข็ง

3.6 นำมาทดสอบกับเนื้อเยื่อโดยหยด สารละลายให้ท่วมเนื้อเยื่อที่ทดสอบ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเกิดสีน้ำเงิน

3.7 ล้างเนื้อเยื่อด้วย 70% ethanol

4. การบันทึกข้อมูล

จะทำการบันทึกข้อมูลทุก ๆ 2 สัปดาห์

4.1 ความสูงของหน่อเริ่มต้น

4.2 จำนวนราก

4.3 ความยาวราก

4.4 จำนวนใบ

4.5 จำนวนหน่อใหม่

4.6 ความสูงหน่อใหม่

4.7 คำนวณเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน

$$\text{เปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน} = \frac{\text{จำนวนชิ้นที่พบจุดสีน้ำเงิน} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งหมด}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การตรวจสอบผลการทดลอง

ตรวจสอบผลการทดลองโดยวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS assay ตัดใบของปทุมมามาแช่ในสารละลาย X-gluc substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D glucuronidase) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบที่ได้ไปแช่ใน ethanol 70% เพื่อขจัดคลอโรฟิลล์ออก ใบที่มีการแสดงออกของยีน *gus* จะสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase แล้วเปลี่ยน X-gluc ให้ได้สีน้ำเงิน

6. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

6. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลอง	กันยายน	2550
สิ้นสุดการทดลอง	มีนาคม	2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การเจริญเติบโตของหน่อในช่วงสัปดาห์ที่ 4

ภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่หน่อปทุมมา โดยวิธีการใช้ *A.tumefaciens* ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 2301 เป็นพาหะร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ช่วยทำให้เกิดบาดแผล โดยใช้คลื่นเสียงระยะเวลา 0, 30, 60, 90, และ120 วินาที จากนั้นทำการบ่มเชื้อ (co-cultivation)เป็นระยะ เวลา 3 วัน นำมากำจัด *Agrobacterium* และเลี้ยงหน่อปทุมมาบนคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3.0 mg/l ร่วมกับ TDZ 0.5 mg/l ยาปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และ kanamycin 100 mg/l ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ พบว่า

ความสูงหน่อเริ่มต้น

เริ่มสังเกตเห็นจุดกำเนิดหน่อใหม่ พบว่าหน่อที่ไม่ผ่านคลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* มีความสูงมากที่สุดเฉลี่ย 3.32 cm. ส่วนหน่อที่ทำการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีความสูงหน่อเฉลี่ย 2.68, 2.96, 2.41 และ 2.62 cm. ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

จำนวนราก

รากที่เกิดขึ้นมีไม่มาก ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นตุ่มปลายแหลมมีขนาดเล็ก โดยหน่อที่ทำการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30 วินาที มีจำนวนรากมากที่สุดเฉลี่ย 0.13 ราก ส่วนหน่อที่ไม่ผ่านคลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื่อร่วมกับ *Agrobacterium* และหน่อที่ทำการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 60, 90 และ 120 วินาที จะมีจำนวนรากเฉลี่ย 0.10, 0.05, 0.05 และ 0.05 ราก ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ความยาวราก

รากปทุมมาที่เกิดจากหน่อที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกในทุกวิธีการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* แต่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงมีความยาวรากมากที่สุดเฉลี่ย คือ 0.07 cm. รองลงมาคือหน่อที่ผ่านคลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ120 วินาที จะมีความยาวรากเฉลี่ย 0.04, 0.01, 0.02 และ 0 cm. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

จำนวนใบ

ใบที่เกิดขึ้นมายังไม่มีการขยายออกอย่างเต็มที่ โดยหน่อที่ไม่ผ่านคลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 1.18 ใบ ส่วนหน่อที่ทำการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีจำนวนใบเฉลี่ย 1.1, 1, 0.98 และ 0.4 ใบตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

82129

ตารางที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของปทุมมาสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105(pCAMBIA 2301) ร่วมกับการใช้เครื่อง sonicateในระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาการ Sonicate	หน่อเริ่มต้น			
	ความสูงหน่อ[1/]	จำนวนราก	ความยาวราก	จำนวนใบ[2/]
0	3.32 ± 0.11a	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.01	1.18 ± 0.17a
30	2.68 ± 0.18ab	0.13 ± 0.05	0.04 ± 0.02	1.10 ± 0.08a
60	2.96 ± 0.22ab	0.05 ± 0.05	0.01 ± 0.00	1.00 ± 0.13a
90	2.41 ± 0.05c	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.05	0.98 ± 0.18a
120	2.62 ± 0.18bc	0.05 ± 0.05	0.00± 0.01	0.40 ± 0.10b
F-test	*	ns	ns	**
CV%	11.42	127.66	189.34	29.64

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.01$

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test

<u>การเจริญเติบโตของหน่อในช่วงสัปดาห์ที่ 6</u>

ภายหลังการย้ายชิ้นส่วนของปทุมมาลงในอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า

ความสูงหน่อเริ่มต้น

หน่อของปทุมมามีการแตกใบและรากเพิ่มมากขึ้น เริ่มมีการแทงหน่อใหม่ขึ้นโดยหน่อที่ไม่ผ่านคลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* มีความสูงหน่อมากที่สุดเฉลี่ย 3.26 cm. ส่วนหน่อที่ทำการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ120 วินาที จะมีความสูงหน่อเฉลี่ย 3.09, 3.07, 2.97 และ 2.91 cm. ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนราก

รากเกิดเพิ่มมากขึ้น รากเดิมที่เกิดขึ้นมีลักษณะเรียวแหลม สีเขียว ในขณะที่รากเกิดขึ้นใหม่จะมีลักษณะอวบหน่อที่ไม่ผ่านคลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีจำนวนรากมากที่สุด 0.25 ราก ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ120 วินาทีจะมีจำนวนรากเฉลี่ย 0.25, 0.23, 0.15 และ 0.15 ราก ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ความยาวราก

รากจะขยายขนาดยืดยาวออกไปมากกว่าเดิมเล็กน้อยหน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 0.11 cm.ส่วนหน่อที่การปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาทีจะมีความยาวรากเฉลี่ย 0.06, 0.05, 0.05 และ 0.03 cm. ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

จำนวนใบ

ใบที่เกิดขึ้นก่อนจะมีสีเขียวเข้ม ส่วนใบที่เกิดขึ้นใหม่จะมีสีเขียวอ่อน บางใบยังไม่คลี่ออก ใบที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีจำนวนใบสูงสุดเฉลี่ย 1.15 ใบ ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที มีจำนวนใบเฉลี่ย 1.13, 1.10, 0.98 และ 0.63 ใบตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

จำนวนหน่อใหม่

หน่อใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีสีเขียว ยังไม่มีการแตกใบบางหน่อจะมีแคลลัสเกิดขึ้นรอบหน่อยกเว้นหน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* หน่อใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีการแตกใบใหม่ที่สมบูรณ์ และจำนวนหน่อที่เกิดขึ้นมาจะมีมากที่สุดเฉลี่ย 0.75 หน่อ ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที มีจำนวนหน่อเฉลี่ย 0.48, 0.25, 0.05 และ 0.08 หน่อ ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ความสูงหน่อใหม่

หน่อที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีความสูงไม่มากนัก หน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีความสูงหน่อมากที่สุดเฉลี่ย 1.15 cm.ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีความสูงหน่อเฉลี่ย 0.21, 0.14, 0.05 และ 0.04 cm.ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของปทุมมาสัปดาห์ที่ 6 ภายหลังการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105(pCAMBIA 2301) ร่วมกับการใช้เครื่อง sonicateในระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาการ sonicate	หน่อเริ่มต้น				หน่อใหม่	
	ความสูงหน่อ	จำนวนราก	ความยาวราก	จำนวนใบ	จำนวนหน่อ[1/]	ความสูงหน่อ[2/]
0	3.26±0.24	0.25±0.10	0.11±0.05	1.15±0.13	0.75±0.21a	1.15±0.06a
30	3.09±0.17	0.25±0.10	0.06±0.01	1.13±0.15	0.48±0.18ab	0.21±0.06b
60	3.07±1.20	0.23±0.90	0.05±0.02	1.10±0.05	0.25±0.13b	0.14±0.05b
90	2.97±0.26	0.15±0.10	0.05±0.05	0.98±0.21	0.05±0.05b	0.05±0.05b
120	2.91±0.15	0.15±0.15	0.03±0.06	0.63±0.1	0.08±0.05b	0.04±0.03b
F-test	ns	ns	ns	ns	*	**
CV%	12.86	104.43	138.54	27.35	65.73	33.18

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.01$

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test

<u>การเจริญเติบโตของหน่อในช่วงสัปดาห์ที่ 8</u>

ภายหลังการย้ายชิ้นส่วนของปทุมมาลงในอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า

ความสูงหน่อเริ่มต้น

หน่อมีความสูงเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีการแตกใบเพิ่มมากขึ้น และมีการแตกหน่อใหม่เพิ่มขึ้นด้วย หน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีความสูงหน่อมากที่สุดเฉลี่ย 3.67 cm. ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา30, 60, 90 และ 120 วินาทีจะมีความสูงหน่อเฉลี่ย 3.27, 3.17, 2.52 และ 2.66 cm.ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนราก

รากจะเกิดขึ้นเพิ่มมากขึ้น รากที่เกิดก่อนจะมีลักษณะยืดยาวขยายออกไป ส่วนรากที่เกิดขึ้นใหม่จะมีลักษณะเกิดขึ้นเป็นกระจุก พบว่า หน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* มีจำนวนรากสูงสุดเฉลี่ย 0.50 ราก ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีความจำนวนราก 0.40, 0.38, 0.19 และ 0.26 รากตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

ความยาวราก

รากมีการขยายขนาดยืดยาวออกไป รากที่เกิดใหม่มีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มหน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีความยาวรากมากที่สุดเฉลี่ย 0.16 cm. ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีความยาวรากเฉลี่ย 0.08, 0.07, 0.10 และ 0.05 cm. ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

จำนวนใบ

ใบปทุมมาที่เกิดขึ้นก่อนบางใบจะมีลักษณะซีดเป็นสีน้ำตาล ส่วนใบที่เกิดขึ้นมาใหม่จะมีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อน ซึ่งในทุกวิธีการทดลองไม่มีความแตกต่างกันแตกต่างกันทางสถิติโดยหน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 1.58 ใบ ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาทีจะมีจำนวนใบเฉลี่ย 1.38, 1.43, 1.30 และ 1.13 ใบตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

จำนวนหน่อใหม่

จะมีการแตกหน่อใหม่มากขึ้น หน่อที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายยอดหน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีจำนวนหน่อมากที่สุดเฉลี่ย 0.80 หน่อ ส่วนหน่อที่ผ่านการที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีความสูงหน่อเฉลี่ย 0.88, 0.45, 0.55 และ 0.25 หน่อ ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

ความสูงหน่อใหม่

หน่อที่เกิดขึ้นใหม่จะมีความสูงเพิ่มขึ้นไม่มากนัก หน่อที่ไม่ผ่านการใช้คลื่นเสียงในขั้นตอนการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีความสูงหน่อมากที่สุดเฉลี่ย 1.62 cm. ส่วนหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะมีความสูงหน่อเฉลี่ย 0.31, 0.23, 0.10 และ 0.27 cm. ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตของปทุมมาสัปดาห์ที่ 8 ภายหลังการถ่ายโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105(pCAMBIA 2301) ร่วมกับการใช้เครื่องsonicate ในระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการ	หน่อเริ่มต้น				หน่อใหม่	
sonicate	ความสูงหน่อ[2/]	จำนวนราก	ความยาวราก	จำนวนใบ	จำนวนหน่อ	ความสูงหน่อ[2/]
0	3.67±0.13a	0.50 ± 0.13	0.16±0.04	1.58±0.15	0.80±3.63	1.62±0.13a
30	3.27±0.08b	0.40 ± 0.08	0.08±0.04	1.38±0.13	0.88±3.84	0.31±0.08b
60	3.17±0.10ab	0.38 ± 0.10	0.07±0.03	1.43±0.10	0.45±3.06	0.23±0.10b
90	2.52±0.12c	0.19 ± 0.12	0.10±0.07	1.30±0.05	0.55±1.5	0.10±0.12b
120	2.66±0.24c	0.26 ± 0.24	0.05±0.05	1.13±0.20	0.25±2.54	0.27±0.24b
F-test	**	ns	ns	ns	ns	**
CV%	8.89	84.29	103.24	20.13	65.73	46.06

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.01$

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *GUS*

คัดเลือกต้นปทุมมา ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l ในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 1) มาทำการตรวจหายีน *gus* ซึ่งเป็นยีนรายงานผลของพลาสมิด pCAMBIA 2301 โดยใช้ชิ้นส่วนของใบ เมื่อทำปฏิกิริยากับ 5-bromo-4-chloro-3-indole-β-D glucuronidase ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับยีน *gus* จะติดสีน้ำเงิน (ดังภาพที่ 2a) และพบว่าใบที่ได้จากต้นที่มีการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ร่วมกับคลื่นเสียงเป็นเวลา 30 วินาที จะมีการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุดคือ 20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 60 วินาที พบว่าใบที่นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

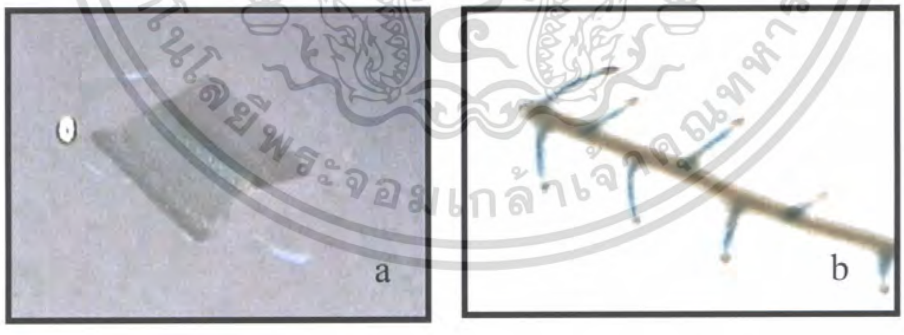
เมื่อนำชิ้นส่วนรากของปทุมมาที่เจริญขึ้นบนอาหารคัดเลือก มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า รากมีการแสดงออกของยีน *gus* (ภาพที่ 2b) แต่การแสดงออกของยีน *gus* ในรากนั้นเกิดขึ้นทั้งในรากของหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียง และรากของหน่อปทุมมาที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียง

ตารางที่ 6 แสดงผลการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) โดย *A. tumefaciens* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงระยะเวลาต่าง ๆ ในหน่อของปทุมมา เมื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus*

ระยะเวลาการ Sonicate (วินาที)	จำนวนหน่อเริ่มต้น	จำนวนหน่อที่สามารถเจริญได้	เปอร์เซ็นต์หน่อที่เจริญได้	จำนวนใบเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนใบที่มีการแสดงออกของยีน *GUS*	เปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน
0	20	4	20	1	0	0
30	20	6	30	6	4	20
60	20	2	10	2	2	10
90	20	2	10	2	0	0
120	20	0	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3.0 mg/l และ TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน *gus* บนใบและรากปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3.0 mg/l และ TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์

a) การเกิดจุดสีน้ำเงินบนใบปทุมมา b) การเกิดจุดสีน้ำเงินบนรากปทุมมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ระหว่างการบ่มชิ้นส่วนหน่อ (co-cultivation) ของปทุมมาร่วมกับสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MS ดัดแปลงที่เติม BA 3.0 mg/l และ TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และkanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าหน่อของปทุมมาที่ไม่ได้ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด เนื่องจากหน่อของปทุมมาไม่ได้รับบาดเจ็บ และ เนื่องจากชิ้นส่วนของหน่อปทุมมาอาจจะใหญ่ ทำให้เนื้อเยื่อไม่สัมผัสอาหารทั้งหมดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีนบางส่วนจึงเจริญได้บนอาหารคัดเลือก จากนั้นนำใบที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า การใช้คลื่นความถี่สูงมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการส่งถ่ายยีนสู่ปทุมมาโดยหน่อที่ผ่านการปลูกเชื้อร่วมกับ *Agrobacterium* และใช้คลื่นเสียงเป็นเวลา 30 วินาที พบว่า มีผลการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด คือ 20 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำส่วนของรากมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า ทั้งรากของหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Agrobacterium* ร่วมกับการใช้คลื่นเสียง และรากของหน่อปทุมมาที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อมีการแสดงออกของยีน *gus* เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Koyama *et al.* (2005) ที่ได้มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในรากของข้าว พบว่า รากของข้าวที่ไม่ได้ทำการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *gus* เช่นเดียวกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *gus* ในรากของปทุมมานั้น ควรมีการศึกษาหาสาเหตุในลำดับต่อไป และไม่สามารถนำรากมาใช้ตรวจสอบความสำเร็จของการถ่ายยีนครั้งนี้ได้

การเกิดบาดแผลช่วยทำให้การบุกรุกของเชื้อ *Agrobacterium* เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้ดีเพราะการเกิดบาดแผลจะช่วยเพิ่มสารประกอบ phenolic (Santarem *et al.*,1998) ซึ่งเป็นสาร สำคัญในการกระตุ้นกระบวนการถ่ายยีน โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* ต้นปทุมมาที่ได้รับการถ่ายยีนบางส่วนจะมีลักษณะที่ผิดปกติ เช่น ลำต้นแคระแกรน นอกจากนี้เมื่อต้นปทุมมาเจริญไปได้สักระยะหนึ่งได้ตายไป เพระเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *Agrobacterium* แสดงให้เห็นว่า การกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ออกจากเนื้อเยื่อพืชเป็นขั้นตอนสำคัญเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Agrobacterium* ทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย และยาปฏิชีวนะในอาหาร มีผลยับยั้งการเจริญของพืชได้เช่นกัน ดังนั้น การเลือกความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการกำจัด *Agrobacterium* ควรเลือกความเข้มข้นต่ำที่สุด ที่สามารถกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ได้โดยมีผลยับยั้งการเจริญของพืชน้อยที่สุด(Dale and Fomukong.,1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมา พบว่า หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการ sonication ที่ระยะเวลาต่าง ๆ แล้วเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3.0 mg/l. และ TDZ 0.5 mg/l ร่วมกับยาปฏิชีวนะ cefotaxine 250 mg/l และ Kanamycin 100 mg/l มีหน่อใหม่เกิดขึ้น ยกเว้นหน่อที่ได้รับการ sonicate 120 วินาที และระยะเวลาของการ sonicate ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด คือ 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกศสุดนธ์ มณีวรรณ. 2549. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้โดยผ่าน *A. tumefaciens*. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสารคาม.

จันทร์เพ็ญ ชอบยิ้มหอม และรวีวรู บัวทอง. 2549. การเพิ่มปริมาณยอดของวนิลลาแพลนิโฟเลียในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี.ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญญานาค นาควงษ์. 2545. ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะในพืชแปลงพันธุกรรม ปัจจุบันและอนาคต. ข่าวสารศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพ และความปลอดภัยทางชีวภาพ. มหาวิทยาลัย - เกษตรศาสตร์. วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

บุษกร หอมกระแจะ. 2548. การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่กล้วยไม้เอื้องเงิน และมิสสิงคโปร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยามหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประวีณา คงโดนกอก. 2544. การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองบางชนิดโดย *Agrobacterium tumefaciens*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปรียา หวังสมนึก, พินิจ หวังสมนึก และบุญถม มาซา. 2545. การศึกษาความหลากหลายและหาแนวทางการพัฒนาการผลิตพืชและปรับปรุงพันธุ์ใน สกุล Curcuma ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยวิธีพันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. หนังสือคู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศ-ไทย. กรุงเทพฯ.

วราพงษ์ ชมาฤกษ์. 2550. พันธุวิศวกรรมพืช. พืชตัดแต่งพันธุกรรม GMOs. ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ.

วริศรา พิลาโฮม. 2548. การส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase สู่เข็มขาวและเอื้องคำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิจิตรา โหราเรือง, กนกวรรณ รมยานนท์, มณฑินา บุญธรรม, สุพัฒน์ อรรถธรรม และ Stanislaw Flasinski. 2549. การพัฒนาเทคนิคการส่งถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในมะละกอ. โครงการสหวิทยาการ สาขาพันธุวิศวกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2541. การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* L. Whlp) โดย *Agrobacterium tumefaciens*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์, พร้อมจิต ศรลัมพ์ และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2545. การชักนำให้เกิด hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง โดยใช้ *A. rhizogenes* K599. ว. วิทย. กษ. 33. 4-5 (พิเศษ) : 123-126

สินีธร สมสืบ. 2544. ระบบการผลิตต้นปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) ระดับอุตสาหกรรมในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. กรมส่งเสริมการเกษตร. กลุ่มส่งเสริมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักส่งเสริมการจัดการสินค้าเกษตร.

อาภัสรา โกษากุล. 2549. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อการพัฒนาหน่อของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ. 2542. เทคนิคการพะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารวิชาการเกษตร. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Borthakur, M. Hazarika, J. and Singh, R. 1999. Agrobacterium – mediated transformation Protocol for micropropagation of Alpinia galanga. Plant cell. Tissue and Organ Culture. 55 : 231-233

Christou, P. 1996. Transformation technology. Trends in Plant Science.1 (12) : 423-431.

Darshna, C., Seema, M., Ranjana, J., Raman, S., P. Ananda, K., Pawan, K. J., 2007. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of trangenes into progeny. Plant Science 172 : 692-700

Dele, J. W., and Fomukong, N. G., 1993. Transpositional activity of IS 986 in Mycobacterium smegmatis. Gene 130, 99-105

Hansen, G. and Wright, S.M. 1999. Recent advances in the transformation of Plants. Trends in Plant Science.1(6) : 226-231

Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Molecular Biology. 35: 205-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W., 1987. GUS fusion; β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marger in higher plant.EMBJ:3901-3907.

Koyama, T.O., Shimizu, T., Jinbo, M., Mizuno, T., Tomita, R., Mitsukawa, K., Kawazu, N., Kimura, T., Ohmiya,T.K. and Sakka, K. 2005. Promoter of *Arabidopsis thaliana* Phosphate Gene Drives Root-Specific Expression of Transgene in Rice. Jornal of Bioscience and Bioengineering. Vol 99, No. 1 p.38-42.

Mahadtanapuk, S., Topoonyanont, N., Handa, T., Sanguansermsri, M., and Anuntalabhochai, S., 2006. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia Gagnep*. Using retarded shoots. Plant Biotechnol. 23 :p. 233-237.

Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–97.

Novak, J., 2003. *Agrobacterium* [online] Available. http://soils1. cses.vt.edu/ch/biol_4684/index.html

Rachmawati, D., Hosaka, T., Inoue, E. and Anzai, H. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica rice cv. Rojolele. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(6): 1193-200.

Santarem, E.R., Tric, H.N., Essing, J.S. and Finer, J.J., 1998. Sonication assisted Agrobacterium – mediated transformation of soybean immature cotyledons : optimization of transient expression. Plant Cell Rep.17:752-759.

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

Tang, W., 2003. Additional virulence genes and sonication enchance Agrobacterium tumefaciens meadiated loblolly pine transformation .Plant Cell Rep.21:555 – 562.

Trick, H.N. and Finger J.J., 1997. SAAT : Sonication Assisted *Agrobacterium* – Mediated Transformation. Transgenic Research. 6 : 329-337.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weber, S., Friedt, W., Landes, N., Molinier, J., Himber C., Rousslin, P., Hahne, G., and Horn.R., 2002 . Improved Agrobacterium – mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) : assessment of macerating enzyme and sonication. Plant Cell Reports. 21: 475 – 482.

Zaochang, B., Park, J., Kanno, A. and Kameya, T., 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in Agrobacterium – mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgalis* L.) rith lea gene.16 : 189 – 197.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
$(NH_4)NO_3$	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.30
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.60
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine·HCl	0.50
Thiamine·HCl	0.10
Glycine	2.00
Sucrose	30,000.00
pH	5.5-5.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	1.9867	0.4967	4.87*	3.06	4.89	0.0103
Error	15	1.5295	0.1020				
Corrected Total	19	3.1625	0.1851				

Grand Mean = 2.7970 CV = 11.4166 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางภาคผนวกที่ 3 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.2971	0.0743	0.48ns	3.06	4.89	0.7522
Error	15	2.3223	0.1548				
Corrected Total	19	2.6194	0.1379				

Grand Mean = 3.0599 CV = 12.8584 %

*ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความสูงหน่อของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	3.5441	0.8860	12.02**	3.06	4.89	0.0003
Error	15	1.1058	0.0737				
Corrected Total	19	4.6499	0.2447				

Grand Mean = 3.0539 CV = 8.8904 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 5 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.0200	0.0050	0.55ns	3.06	4.89	0.7074
Error	15	0.1375	0.0092				
Corrected Total	19	0.1575	0.0083				

Grand Mean = 7.5000 CV = 127.6569 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.0420	0.0105	0.23^{ns}	3.06	4.89	0.9165
Error	15	0.6875	0.0458				
Corrected Total	19	0.7295	0.0384				

Grand Mean = 0.2050 CV = 104.4328 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 7 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.2305	0.0576	0.67^{ns}	3.06	4.89	0.6239
Error	15	1.2869	0.0858				
Corrected Total	19	1.5174	0.0799				

Grand Mean = 0.3475 CV = 84.2884 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.0103	0.0026	1.07^{ns}	3.06	4.89	0.4083
Error	15	0.0364	0.0364				
Corrected Total	19	0.0467	0.0025				

Grand Mean = 2.5999 CV = 189.3360 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 9 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.0125	0.0038	0.56^{ns}	3.06	4.89	0.6989
Error	15	0.1019	0.0068				
Corrected Total	19	0.1171	0.0062				

Grand Mean = 5.9499 CV = 138.5408 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 10 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.0269	0.0067	0.80^{ns}	3.06	4.89	0.5468
Error	15	0.1267	0.0084				
Corrected Total	19	0.1536	0.0081				

Grand Mean = 8.8999 CV = 103.2445 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 11 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	1.5070	0.3767	4.96**	3.06	4.89	0.0096
Error	15	1.1398	0.0760				
Corrected Total	19	2.6468	0.1393				

Grand Mean = 0.9300 CV = 29.6405 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 12 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.8330	0.2083	2.73^{ns}	3.06	4.89	0.0685
Error	15	1.1450	0.0763				
Corrected Total	19	1.9780	0.1041				

Grand Mean = 1.0100 CV = 27.3549 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 13 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	0.4530	0.1132	1.50^{ns}	3.06	4.89	0.2515
Error	15	1.1325	0.0755				
Corrected Total	19	1.5855	0.0834				

Grand Mean = 1.3650 CV = 20.1299 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 14 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	3.5077	0.8769	79.54**	3.06	4.89	0.0000
Error	15	0.1654	0.0110				
Corrected Total	19	3.6731	0.1933				

Grand Mean = 0.3164 CV = 33.1754 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 15 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	6.3096	1.5774	29.33**	3.06	4.89	0.0000
Error	15	0.8068	0.0538				
Corrected Total	19	7.1165	0.3746				

Grand Mean = 0.5035 CV = 46.0622 %

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 16 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	1.3870	0.3468	4.46*	3.06	4.89	0.0142
Error	15	1.1650	0.0777				
Corrected Total	19	2.5520	0.1343				

Grand Mean = 0.3200 CV = 87.0898 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางภาคผนวกที่ 17 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของการ sonicate ต่อจำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

source	DF	Sum of Square	Mean Square	F-test	F.05	F.01	F-Prob
Model	4	1.0480	0.2620	1.77^{ns}	3.06	4.89	0.1865
Error	15	2.2175	0.1478				
Corrected Total	19	3.2655	0.1719				

Grand Mean = 0.5850 CV = 65.7250 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้