สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

# การศึกษาผลของสารกระตุ้น acetosyringone ต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

# The Effect of Acetosyringone on *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Curcuma alismatifolia*.

โดย

นางสาวนันทิยา เพลียศรี

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว

SB371
.A65
P55C

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....82128
วัน,เดือน,ปี.....-8 ก.ค. 2551

.b.....1194593x
.i.....

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)

พุทธศักราช 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การศึกษาผลของสารกระตุ้น acetosyringone ต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา
โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

The Effect of Acetosyringone on *Agrobacterium*-Mediated
Transformation in *Curcuma alismatifolia.*

โดย

นางสาวนันทิยา เพลียศรี

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)
หัวหน้าภาควิชาพืชสวน
วันที่ 1 เดือน 14 พ.ศ. 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| เรื่อง | การศึกษาผลของสารกระตุ้น acetosyringone ต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ<br>The Effect of Acetosyringone on *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Curcuma alismatifolia.* |
| โดย | นางสาวนันทิยา เพลียศรี |
| สาขาวิชา | พืชสวน |
| ภาควิชา | พืชสวน |
| คณะ | เทคโนโลยีการเกษตร |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผศ. ดร.กัญจนา แซ่เตียว |


## บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารกระตุ้น acetosyringone ที่ใช้ร่วมกับการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา โดยเลี้ยง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA2301 ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกร่วมกับการใช้ acetosyringone ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 μM ในระหว่างการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 นาที และการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ร่วมกับชิ้นส่วนพืช จากนั้นเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone มีหน่อใหม่เกิดขึ้นได้บนอาหารคัดเลือก แต่หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone ไม่มีหน่อใหม่เกิดขึ้น จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยวิธี GUS assay พบว่า การเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อและการบ่มเชื้อร่วมกับหน่อปทุมมา มีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน โดยพบว่ามีการแสดงออกของยีน *GUS* สูงสุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| Title | The Effects of Acetosyringone on *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Curcuma alismatifolia*. |
| By | Miss Nanthiya Pliasri |
| Major | Horticulture |
| Department | Horticulture |
| Faculty | Agricultural Technology |
| Advisor | Assist. Prof. Dr. Kanjana Seatiew |


**Abstract**

The effects of acetosyringone on gene transfer by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 carrying pCAMBIA 2301 plasmid was studied. The plasmid contained $\beta$-glucuronidase (*gus*) as a reporter gene and neomycin phosphotransferase gene (*NPTII*) as a selectable marker gene. The inoculation and co-cultivation of *Agrobacterium* with plant tissue added with MS medium containing acetosyringone 0, 50, 100, 200 and 300 µM. The explants were inoculated for 5 min and co-cultivated for 3 days. The explants were cultured on MS medium containing 3 mg/l BA, 0.5 mg/l TDZ and 100 mg/l kanamycin. After 8 weeks in culture, the explants with acetosyringone performed new bud, but the explants without acetosyringone did not show new bud. After gus assay was demonstrated, it was found that the transgenic tissues showed highest performance of gus gene after co-cultivated with 200 µM acetosyringone.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่อง การศึกษาผลของสารกระตุ้น acetosyringone ต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ สามารถสำเร็จลุล่วงได้ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ดร.กัญจนา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขเพิ่มเติมจนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากที่สุด รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ให้

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และ ญาติ ๆ ทุกท่าน ที่คอยให้การสนับสนุนและคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด และขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ ๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำ และเพื่อน ๆ ที่ คอยให้การช่วยเหลือมาโดยตลอด จนปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นันทิยา เพลียศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | ก |
| สารบัญตาราง | ข |
| สารบัญภาพ | ค |
| สารบัญภาคผนวก | ง |
| คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้ | จ |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 11 |
| ผลการทดลอง | 14 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 24 |
| สรุปผลการทดลอง | 26 |
| เอกสารอ้างอิง | 27 |
| ภาคผนวก | 30 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แสดงการเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของสารกระตุ้น acetosyringone..... ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมาภายหลังการถ่ายยีน 4 สัปดาห์ | 16 |
| 2 | แสดงการเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของสารกระตุ้น acetosyringone..... ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมาภายหลังการถ่ายยีน 8 สัปดาห์ | 20 |
| 3 | แสดงผลการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ในปทุมมาโดย *Agrobacterium*..... *tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 | 22 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะการเจริญเติบโตหน่อเริ่มต้น และลักษณะหน่อใหม่ของหน่อปทุมมา..... ที่ได้รับการปลูกเชื้อ และบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 19 |
| 2 | การแสดงออกของยีน *GUS* บนใบของปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและ..... บ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 22 |
| 3 | การแสดงออกของยีน *GUS* บนรากของปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและ..... บ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 23 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาคผนวก

**ตารางภาคผนวกที่** **หน้า**


1 อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog , 1962)..... 30

2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม stock..... 31

3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย buffer..... 31

4 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 32
ความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

5 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 32
ความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

6 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 33
จำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

7 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 33
จำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

8 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 34
ความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

9 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 34
ความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

10 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 35
จำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

11 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 35
จำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

12 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 36
จำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

13 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 36
จำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

14 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 37
ความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

15 ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อ..... 37
ความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำย่อที่ใช้ในรายงานฉบับนี้

| | |
|---|---|
| BA | benzyladenine |
| TDZ | 1-phenyl-3-1,2,3-thiadiazol-5-yi urea |
| 2,4-D | 2,4-dichlorophenoxy acetic acid |
| IAA | Indole-3-acetic acid |
| mg/l | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| mg | มิลลิกรัม |
| g | กรัม |
| M | โมล |
| mM | มิลลิโมล |
| µM | ไมโครโมล |
| cm | เซนติเมตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนำ

ปัจจุบันมูลค่าของการส่งออกปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) ในแต่ละปีมีประมาณ 15-30 ล้านบาทต่อปี และยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งตลาดต่างประเทศยังมีความต้องการสูงอยู่ การส่งออกปทุมมาส่วนใหญ่ จะเป็นการส่งออกในรูปของหัวพันธุ์มากกว่าการส่งออกดอก เนื่องจากง่ายต่อการขนส่ง เพื่อเป็นการขยายตลาดใหม่ให้สามารถส่งออกปทุมมาได้มากขึ้น และยังคงครองตลาดเก่าให้ได้นาน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงพันธุ์ และพัฒนาสายพันธุ์ของปทุมมาให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น มีลักษณะดีตรงตามความต้องการของตลาด

เทคโนโลยีชีวภาพเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่ได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย และรวดเร็ว เทคนิคต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการนี้ มีด้วยกันหลายเทคนิค แต่ละเทคนิคก็จะมีความเหมาะสมแตกต่างกันไปในแต่ละพืช การนำยีนที่มีลักษณะตรงตามความต้องการเข้าสู่พืช โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะนั้น เป็นเทคนิคหนึ่งที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพสูง แต่การถ่ายยีนด้วยวิธีการนี้ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ คือ จะได้ผลดีเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากในธรรมชาติ เชื้อชนิดนี้จะไม่เข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พบว่า acetosyringone ซึ่งเป็นสารประกอบ phenolic ที่พืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล มีส่วนช่วยในการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้น เพื่อให้การถ่ายยีนในปทุมมาซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนเข้าไปได้สูง และมีประสิทธิภาพ จึงต้องมีการศึกษาความเข้มข้นของ acetosyringone ที่เหมาะสมที่ทำให้ *Agrobacterium* สามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด

## วัตถุประสงค์การศึกษา

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ acetosyringone ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตรวจเอกสาร

ปทุมมามีชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma alismatifolia* เป็นไม้หัวล้มลุกอายุหลายปีมีลำต้นใต้ดินแบบเหง้า อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) สกุลขมิ้น (Curcuma) มีถิ่นกำเนิดในแถบอินโดจีน เช่น พม่า และไทย สำหรับในประเทศไทยนั้นมีการกระจายเกือบทุกภาคของประเทศ แหล่งที่พบส่วนใหญ่เป็นป่าโปร่งมีต้นไม้ขึ้นสลับ ฤดูแล้งหัวไม้จะพักตัว ฤดูฝนลงก็จะแทงใบอ่อนขึ้น เมื่อสะสมอาหารได้ที่ก็จะแทงช่อดอกแข่งกันบาน ออกดอกสวยงามเหมือนทุ่งทิวลิปของฮอลแลนด์ชาวต่างประเทศจึงเรียกว่า Siam Tulip (สุปราณี, 2540)

นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกพืชในสกุลขมิ้น โดยแบ่งเป็น 2 สกุลย่อย ได้แก่ (อรวรรณ, 2548)

1. สกุลย่อย Eucurcuma หรือกลุ่มกระเจียว ลักษณะเด่นสังเกตที่ดอกจริง ปากกลีบดอกจะมีสีขาวหรือสีเหลือง และการออกดอกช่อกดอกที่เกิดจะเกิดจากเหง้าโดยตรง หรือช่อดอกเกิดจากตายอกของลำต้นเทียม เช่น ฉัตรทิพย์ ฉัตรทอง พลอยชมพู พลอยทักษิณ เป็นต้น

2. สกุลย่อย Paracurcuma หรือกลุ่มปทุมมา ลักษณะเด่นสังเกตที่ดอกจริงที่ปากกลีบดอกจะมีสีขาวหรือม่วง และการออกดอกช่อดอกจะเกิดจากตาข้างของลำต้นเทียม เช่น ปทุมมา พลอยมยุรา แวววุบล เทพรำลึก เป็นต้น

**ลักษณะทางพฤกษศาสตร์** (อรวรรณ, 2548)

**ราก**

รากเป็นระบบรากฝอย ปลายรากส่วนหนึ่งที่ปลายบวมพองออก มีลักษณะเป็นตุ้ม ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำ และอาหาร เพื่อใช้ในช่วงพักตัวและช่วยในการงอก ในการเก็บรักษาหัวพันธุ์เก็บนานตุ้มจะค่อย ๆ เหี่ยวลง หัวพันธุ์ที่ไม่มีตุ้มรากก็สามารถงอกได้เช่นกัน

**ลำต้น**

พืชสกุลขมิ้น ลำต้นที่เห็นเหนือดินจะเป็นลำต้นเทียม (Pseudostem) ลำต้นจริงอยู่ใต้ดินทำหน้าที่สะสมน้ำ และอาหาร เรียกว่า เหง้า (Rhizome) ตาข้างของเหง้าเจริญเติบโตเป็นลำต้นเทียมอยู่เหนือดิน ซึ่งเกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบภายในลำต้นเทียม

**ใบ**

ใบปทุมมาเป็นใบเดี่ยว ที่ประกอบด้วยกาบใบที่ห่อรวมตัวกันแน่น เกิดเป็นลำต้นเทียม ก้านใบชูออกจากลำต้นเทียมในมุมที่ต่างกัน แผ่นใบเป็นใบเดี่ยวมีรูปร่างเป็นวงรี แคบบ้าง ป้อมบ้าง โคนใบมนหรือเรียว ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่น ปลายใบป้านหรือแหลม เส้นใบขนานแบบเฉียงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ช่อดอก**

เป็นแบบช่อแน่น (compact spike) ประกอบด้วยกลีบของใบประดับ (bract) เรียงซ้อนกันเกิดเป็นช่อทรงกระบอก โอบรอบโคนช่อดอกย่อย โดยเรียงซ้อนกันเวียนเป็นเกลียวหรือเรียงเป็นแถว เกิดเป็นช่อมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ภายในถ้วยของใบประดับเป็นที่อยู่ของช่อดอกย่อย แต่ใบประที่อยู่ส่วนบนของช่อดอกจะไม่มีช่อดอกย่อย ส่วนที่มีสีสันสวยงามที่เราเห็นอยู่ภายนอกคนทั่วไปเรียกว่า ดอก ที่จริงแล้ว คือ ใบประดับส่วนบน (coma bract) หรือกลีบประดับ ส่วนดอกจริงซ่อนอยู่ข้างในช่อของกลีบประดับส่วนล่าง

**ผลและเมล็ด**

ภายหลังจากที่มีการผสมพันธุ์แล้ว ผลจะมีรูปหน้าตัดเป็นเหลี่ยม 3 เหลี่ยม พัฒนาเป็น 3 พู ภายในแต่ละพูเป็นที่อยู่ของเมล็ดคล้ายเมล็ดอ่อน ผลมีอายุประมาณ 1-2 เดือน ผลแก่มีผนังบาง และภายในเห็นเมล็ดแก่สีน้ำตาลเข้มงอกในฤดูฝน

**การขยายพันธุ์** (สุรวิช, 2537)

การขยายพันธุ์ไม้ดอกสกุลนี้ทำได้หลายวิธี คือ

1. **การเพาะเมล็ด** เป็นวิธีที่ต้องดำเนินการภายหลังการผสมพันธุ์ ดอกของปทุมมาพร้อมที่จะมีการถ่ายละอองเรณูได้ตั้งแต่ดอกเริ่มบานจนถึง 10.00 น.ละอองเรณูของไม้ดอกประเภทนี้มีความเป็นหมันในระดับปานกลางถึงต่ำ จึงต้องรีบถ่ายละอองเรณูในขณะที่ความชื้นสัมพัทธ์ยังอยู่ในระดับสูง

การถ่ายละอองเรณูสามารถกระทำได้ โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมขูดละอองเรณูของต้นแม่พันธุ์ทิ้ง โดยขูดจากปลายอับเรณูลงมาทางด้านโคน แล้วจึงขูดละอองเรณูของต้นพ่อพันธุ์มาแตะที่ปลายยอดเกสรตัวเมีย จากนั้นเด็ดส่วนปลายที่เป็นพื้นที่ซึ่งแมลงกามทูตลงมาเกาะช่วยถ่ายละอองเรณูทิ้ง เพื่อป้องกันการผสมทับ

หลังจากผสมพันธุ์แล้วต้องแขวนป้าย แม่พันธุ์ × พ่อพันธุ์ และวันที่ผสมไว้อย่างชัดเจน โดยเกี่ยวกับขอบใบประดับที่รองดอกไว้ เมื่อถ่ายละอองเกสรได้ 1-2 วัน ควรฉีกใบประดับที่รองดอกออกเพื่อตรวจดูว่ามีการพัฒนาของผลขึ้นหรือไม่ หากมีการพัฒนาขึ้นก็ต้องกำจัดดอกที่เหลือในช่อดอกย่อยนั้นทิ้งเพื่อป้องกันความสับสน แต่หากไม่มีการพัฒนาของผลก็ควรปลดป้ายระบุคู่ผสมนั้นทิ้งเสีย

หลังจากถ่ายละอองได้ 1-2 เดือน ควรรีบนำเมล็ดมาเพาะในกระบะบรรจุทรายผสมถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1 โดยให้เมล็ดจมลงไปในวัสดุปลูกลึกประมาณ 0.5-1 cm. เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 5 ใบ จึงค่อยแยกต้นกล้าไปปลูก ปกติต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดจะใช้เวลาราว 2 ปี จึงให้ช่อดอกหรือผลิตหัวพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. การแยกเหง้า** เป็นวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ต้นที่ได้นั้นมีลักษณะคงเดิมเหมือนต้นแม่พันธุ์ กลุ่มของพืชที่เกิดจากการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแล้วมีลักษณะเหมือนกันนี้เรียกว่าโคลน (clone) ปทุมมาจะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน เหง้าของลำต้นเทียมที่แก่เต็มที่ หรือมีดอกแล้วเท่านั้นที่จะบวมพองสะสมน้ำและอาหารไว้ โดยมีการเตรียมโครงสร้างภายนอกให้เหมาะกับการผจญสภาพแล้งด้วย ในหนึ่งฤดูปลูกนั้นเหง้า 1 เหง้าจะเกิดเป็นลำต้นเทียม 1-2 ต้น ซึ่งจะแตกหน่อออกไปในระหว่างหนึ่งฤดูปลูกประมาณ 20 หน่อ เมื่อสิ้นสุดฤดูปลูกแล้ว แต่ละกอจะมีเหง้าหลายเหง้าเชื่อมติดกัน เมื่อขุดเหง้าเหล่านี้ขึ้นมาแล้วจะสามารถใช้มือบิ หรือหักกลุ่มของเหง้าออกจากกันเป็นเหง้าเดี่ยว ๆ ได้ง่าย เมื่อผึ่งให้เหง้าแห้งแล้วจึงคลุกยาป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อรา ก่อนนำหัวพันธุ์เหล่านี้ไปเก็บรักษาในที่ร่ม และเย็นต่อไป

**3. การผ่าเหง้า** เป็นวิธีเพิ่มชิ้นส่วนของหัวพันธุ์ให้มากขึ้น เพื่อช่วยให้ผู้ปลูกเลี้ยงประหยัดการใช้หัวพันธุ์เริ่มต้นวิธีการนี้เป็นการนำเหง้ามาผ่าแบ่งตามยาวเป็น 2 ชิ้นเท่า ๆ กัน โดยแนวการผ่าจะต้องอยู่กึ่งกลางระหว่างตาที่อยู่สองข้างของเหง้า ชิ้นเหง้าที่ได้ควรมีตาข้างที่สมบูรณ์ไม่น้อยกว่า 1 ตา และมีรากสะสมอาหารติดมาอย่างน้อย 1 ราก เมื่อผ่าเหง้าแล้วจะต้องมีการป้องกันกำจัดเชื้อรา ไม่ให้เข้าทำลายบริเวณบาดแผล โดยอาจใช้ปูนแดงทาปิดปากแผลก็ได้ การผ่าเหง้านี้ควรทำก่อนปลูกเล็กน้อยเท่านั้น เพราะชิ้นเหง้าเหล่านี้ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน การปลูกโดยใช้ชิ้นเหง้าที่ได้จากการขยายพันธุ์วิธีนี้ ต้องให้การดูแลเรื่องปุ๋ย และความชื้นเป็นอย่างดี เนื่องจากหัวพันธุ์ที่ใช้มีอาหารสะสมที่น้อยกว่าปกติจะงอกช้า และอาจให้ช่อดอกที่มีคุณภาพต่ำกว่าปกติหากขาดการเอาใจใส่ที่ดี

**4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณต้นพืชโคลนเดียวกันให้มากในเวลาที่สั้น ชิ้นส่วนเริ่มต้นสำหรับการขยายโคลนวิธีนี้ คือ ตาข้างของเหง้า และช่อดอกอ่อน เนื่องจากวิธีการนี้จะต้องทำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นปราศจากจุลินทรีย์ จึงนิยมนำเอาช่อดอกอ่อนซึ่งสะอาดกว่าเหง้ามาใช้ โดยช่อดอกอ่อนระยะที่ดีที่สุดนั้น ควรเป็นช่อดอกที่เพิ่งโผล่ออกจากลำต้นเทียม และใบประดับต้องอยู่ในสภาพปิดหุ้มอยู่ เมื่อเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อน ซึ่งตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 1 cm. ในอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (1962) ที่ดัดแปลงโดยเติม BA อัตรา 5 mg/l ร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน อัตรา 150 ml/l โดยเพิ่มปริมาณเป็น 3 เท่า ทุก 6 สัปดาห์ ซึ่งจะให้พืชประมาณ 500,000 ต้น ในเวลาไม่เกิน 2 ปี เมื่อต้นกล้าโตเต็มขวดแล้ว นำขวดมาเปิดฝาทิ้งไว้ในที่ร่มประมาณ 3-5 วัน ก่อนนำต้นออกมาล้างเอาวุ้นอาหารออกจากบริเวณรากให้หมด แล้วนำไปปลูกในเรือนเพาะชำต่อไป ต้นเหล่านี้จะใช้เวลาประมาณ 2 ปีที่จะผลิตดอกหรือหัวพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การถ่ายยีนในพืช**

การถ่ายยีนในพืชทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งใช้รองรับการถ่ายยีนมีความก้าวหน้าไปมาก สามารถเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ลำต้น กิ่ง ดอก อับเรณู จนถึงกลุ่มเซลล์ และโปรโตพลาสต์ จนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ การสร้างพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) หรือการศึกษาการแสดงออกของยีนใด ๆ ในพืชจึงไม่ใช่สิ่งที่เป็นไปไม่ได้อีกต่อไป

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

**ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช**

1. โคลนยีนศึกษารายละเอียดของยีนที่ต้องการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (gene cloning and identification) และจัดทำพลาสมิดสำหรับถ่ายยีน
2. พัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชให้เป็นต้นพืช (plant regeneration) ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ถ่ายยีนแล้วให้เป็นต้นพืช
3. ถ่ายยีน (หรือ DNA) เข้าสู่โครโมโซมพืช (gene transfer to plant) ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับ explant (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี ชีวภาพแห่งชาติ, ม.ป.ป.)

วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Methods of plant transformation) มีเทคนิคในการถ่ายยีนหลายวิธี ดังนี้

**การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)**

**การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี** การถ่ายฝากยีนวิธีนี้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ประกอบมากนัก การถ่ายยีนจะถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากพืชแล้วนำมาบ่มรวมกับสารละลาย DNA ที่เตรียมไว้ นิยมใส่สารละลาย Polyethylene glycol (PEG) ร่วมด้วย ให้มีความเข้มข้นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ กลไกการทำงานที่แท้จริงของ PEG ยังไม่ทราบ แต่สันนิษฐานว่า PEG จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง จึงมีโอกาสที่ DNA จากภายนอกจะเข้าไปภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ได้มากขึ้น ในการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ก็นิยมใช้สารละลาย PEG ร่วมกับการใช้ความร้อนระยะสั้น ๆ อย่างทันทีทันใด (heat shock) โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลาย DNA และ PEG มาใส่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายมาใส่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 วินาที (สุรินทร์, 2543)

**การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)** เป็นวิธีการที่ใช้ทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้กระแสไฟฟ้านำมาประยุกต์ใช้ในการถ่ายยีนในพืช โดยนำโปรโตพลาสต์มาบ่มรวมกับสารละลาย DNA แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปเพื่อทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ และ DNA มีโอกาสแทรกเข้าสู่เซลล์ทางช่องเปิดนั้น ในสารละลายอาจจะมีสาร PEG ด้วยก็ได้ กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าต่ำ ระยะเวลานาน (long pulse) และระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าสูงกว่า แต่ใช่เวลาสั้น (short pulse) ทั้งนี้ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ใช้และเวลา ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรโตพลาสต์ การทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์นี้นอกจากจะใช้กระแสไฟฟ้าธรรมดาอาจจะใช้แสงเลเซอร์ โดยแสงเลเซอร์สามารถทะลุผ่านผนังเซลล์ได้ ดังนั้นส่วนของพืชที่นำมาใช้อาจจะใช้กับโปรโตพลาสต์ หรือเซลล์ที่อยู่ในสภาพแคลลัสก็ได้ (สุรินทร์, 2543)

**การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection)** วิธีการนี้ทำได้โดยใช้โปรโตพลาสต์ที่ได้จากเซลล์ใดก็ได้ แล้วฉีด DNA เข้าไป พืชมีแวคิวโอลซึ่งเป็นที่เก็บเอนไซม์ และสารพิษหลายชนิด การฉีดจึงต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกแวคิวโอลแตก เพราะมักจะทำให้เซลล์ตาย บางครั้งพบว่านิวเคลียสซ่อนอยู่หลังแวคิวโอล ทำให้ไม่สามารถฉีด DNA เข้าไปได้ วิธีแก้ปัญหา คือ เลือกเซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่ริมขอบเซลล์ในทิศทางของเข็มที่ใช้ฉีด แต่เซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่ขอบเซลล์มักจะไม่แข็งแรง อีกทางหนึ่ง คือ ทำให้เซลล์เกาะติดอยู่กับที่เพื่อสะดวกในการฉีดโดยมี micromanipulator หรือ holding pipette ดูดเซลล์ไว้ หรือทำให้เซลล์เกาะติดกับแก้วโดยเคลือบแก้วด้วยสาร poly L-lysine หรือ ใช้วิธีฝังโปรโตพลาสไว้ในอะกาโรสแล้วจึงเลือกฉีด DNA เข้าสู่โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม (สุรินทร์, 2543)

**การถ่ายยีนโดยเครื่องยิง (particle gun หรือ microprojectile bombardment หรือ biolistic technique)** วิธีนี้จะใช้อนุภาคทังสเตน หรือทองขนาดเล็กประมาณ 1-4 ไมครอน เคลือบด้วย DNA ที่ต้องการถ่ายเข้าเซลล์แล้วใส่ลงในเครื่องยิงกระสุนเคลือบ DNA นั้นเข้าสู่เซลล์ประมาณ 1,400 ฟุตต่อวินาที ด้วยความเร็วดังกล่าวนี้ อนุภาคที่ใช้จะแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายใน และพาเอา DNA หรือ RNA เข้าไปด้วย วิธีนี้ทำได้ง่ายกว่าวิธีฉีด เพราะครั้งหนึ่ง ๆ สามารถยิงอนุภาคเข้าไปได้เป็นพันอนุภาค ใช้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์โดยไม่ต้องทำเป็นโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ถ่ายยีนไปที่ออร์แกเนลล์ได้ด้วย เช่น ถ่ายยีนไปที่ไมโตคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ (สุรินทร์, 2543)

**การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ**

**การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)**

*Agrobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อาศัยอยู่ในดิน ชนิดที่นิยมใช้ในการถ่ายยีน คือ *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรค crow gall ที่เกิดในพืชใบเลี้ยงคู่ อาการของโรค คือ ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม ในลักษณะของเนื้องอกที่ลำต้นใกล้รอยต่อกับผิวดิน สาเหตุของการเกิดปุ่มปมนี้เนื่องจากมีการถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน auxin และ cytokynin ไปพร้อมกับยีนอื่น ๆ จากแบคทีเรียเข้าไปรวมตัวกับโครโมโซมของพืช ทำให้เซลล์บริเวณที่ติดเชื้อสามารถสังเคราะห์ auxin และ cytokynin ได้เอง โดยปราศจากกลไกการควบคุม เซลล์จึงแบ่งตัวผิดปกติ และเกิดเป็นก้อนขึ้น นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาถึงกลไกการถ่ายยีนเหล่านี้ และพบว่าสามารถตัดยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการเกิดโรคออก แล้วใส่ยีนใหม่ที่เป็นประโยชน์เข้าไปแทนได้ เมื่อพืชถูก infect ด้วยเชื้อนี้ ยีนที่เป็นประโยชน์เหล่านั้นก็จะถูกถ่ายเข้าสู่พืช จึงเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนให้แก่พืช (สนธิชัย, 2543)

**พลาสมิดใน *Agrobacterium***

*Agrobacterium* จะมีพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140-235 กิโลเบส เรียกพลาสมิดนี้ว่า Tumor inducing plasmid หรือ Ti plasmid *Agrobacterium* ที่พบพลาสมิดนี้ คือ *A. tumefaciens* ซึ่งพลาสมิด Ti จะทำให้พืชเกิดลักษณะปุ่มปมหลังได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผล เกิดจากการเจริญอย่างรวดเร็วของเซลล์คอร์เทกซ์ และเมื่อ *Agrobacterium* บุกรุกเข้าไปในพืชจะมี DNA บางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกถ่ายทอด และแทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียก DNA นี้ว่า T(transferred) DNA ยีนในส่วน T-DNA มีบทบาททำให้พืชสร้างโอปีนโดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ ออกโทปีนดีไฮโดรจีเนส (octopine dehydrogenase) และโนปารีนดีไฮโดรจีเนส (nopaline dehydrogenase) ที่ถูกกำหนดโดยยีนบนส่วน T-DNA ซึ่งเป็นส่วนที่มีผลกระตุ้นทำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัว และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเกิดเป็นปุ่มปม (ปรีชา, 2543)

**กลไกการย้ายยีนของ *Agrobacterium tumefaciens***

กลไกการส่งถ่ายยีนโดยรวม คล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ conjugation ของแบคทีเรีย กระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบ phenolic จากพืช คือ acetosyringone (AS) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน chromosomal virulence(*Chv*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และยีน virulence(*Vir*) ที่อยู่บนพลาสมิด Ti

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย T-DNA จะถูกตัดเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *Vir* D ที่ ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบ DNA สายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางขวา (right border, RB) ไปเรื่อย ๆ ส่วน RB นี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางซ้าย (left border, LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้น DNA ที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าจะไม่มีส่วน LB การส่ง T-strand ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอน เพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2543)

กลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีน *Vir* ที่อยู่ในพลาสมิด Ti กลุ่มยีนนี้ประกอบด้วย ยีนตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้

*Vir* A มีหนาที่เกี่ยวกับการควบคุม โดยจดจำสารประกอบพวก phenolic ซึ่งผลิตจากพืช และไปกระตุ้นยีน *Vir* G

*Vir* G มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมเช่นกัน โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนอื่น ๆ ในกลุ่ม

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

*Vir* C เกี่ยวข้องกับการกำหนดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และชนิดของพืชที่จะเข้าบุกรุก (host range determination) แต่ยังไม่ทราบว่ามีวิธีการอย่างไร

*Vir* E เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับ DNA สายเดี่ยว เพื่อให้ T-DNA มีความคงตัวในระหว่างและหลังจากมีการส่งถ่ายยีน

*Vir* B ยังไม่ทราบหน้าที่

**ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลที่ใช้ในพืช**

พลาสมิด Ti ประกอบด้วยยีนเครื่องหมาย (marker gene) และยีนรายงานผล (reportor gene) ที่มีข้อแตกต่างกัน คือ ยีนเครื่องหมายเป็นยีนที่ใช้กำหนดลักษณะบางประการในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนโดยการถ่ายฝาก ทำให้สามารถแยกออกได้โดยง่ายเพื่อใช้ตรวจสอบผลของการถ่ายฝากยีน ส่วนยีนรายงานผลเป็นยีนที่ใช้ในการกำหนดลักษณะที่ทำให้ทราบว่าส่วนของ โปรโมเตอร์ที่ต่อกับยีนนั้นมีการแสดงออกหรือไม่ และสามารถแสดงออกได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใดในพืช ยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลอาจเป็นยีนชนิดเดียวกันก็ได้ ถ้าใช้เป็นยีนเครื่องหมายก็จะต่ออยู่กับโปรโมเตอร์ที่ทราบว่าทำงานได้ตลอดเวลาในเนื้อเยื่อทุกชนิดของพืช แต่ถ้าใช้เป็นยีนรายงานผล ก็จะต่ออยู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรโมเตอร์ (สุรินทร์, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

ประสิทธิ และพงศธร (2542) ศึกษาการย้ายยีนในข้าวโพด โดยใช้ *Agrobacterium* พบว่า ปัจจัยการย้ายยีน โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 และ EHA 105 เอ็มบริโออายุ 5 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย acetosyringone 100 μM และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จะมีเปอร์เซ็นต์ย้ายยีนมากที่สุด

ปราการ และสุกัญญา (2543) ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ พบว่า ผลของการย้ายยีนจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของข้าว สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* ความเข้มข้นของ *Agrobacterium* ความเข้มข้นของ acetosyringone และอายุของแคลลัส ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวพันธุ์เจ้าหอมคลองหลวง 1 คือ *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 ความเข้มข้น OD ที่ 0.1 ความเข้มข้นของ acetosyringone 100 μM และอายุแคลลัส 9 วัน ข้าวสุพรรณบุรี 1 คือ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้น OD ที่ 0.01 ความเข้มข้นของ acetosyringone 100 μM และอายุแคลลัส 7 วัน และข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 คือ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 ความเข้มข้น OD ที่ 0.1 ความเข้มข้น acetosyringone 50 μM และอายุแคลลัส 7 วัน

เทิดศักดิ์ และธำรงค์ (2544) ศึกษาการย้ายยีนในข้าวเหนียวโดย *Agrobacterium* พบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวเหนียวดำ คือ เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้นของ acetosyringone 100 μM และอายุของแคลลัส 5 วัน และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย้ายยีนของข้าวเหนียวสันป่าตอง อายุแคลลัส 10 สัปดาห์ คือ เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 และความเข้มข้นของ acetosyringone 100 μM

ฐิติมา และสุภาลัย (2544) ศึกษาการย้ายยีนในหญ้า โดยใช้ *Agrobacterium* พบว่า เปอร์เซ็นต์การย้ายยีนที่ดีที่สุดเมื่อใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ชิ้นส่วนที่เป็นข้อปล้อง และเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4 - D 3 mg/l และ acetosyringone 50 μM

วิจิตรา และคณะ (2547) ทำการทดสอบการเติมสารเคมีที่เหมาะสม ในการเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม acetosyringone ที่มีความเข้มข้น 0, 100 และ 200 μM ร่วมกับ ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 0, 50 และ 100 mg/l ก่อนนำมาใช้ในการถ่ายยีน จากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay พบว่าการทำ pre- culture โดยเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม ascorbic acid ความเข้มข้น 100 mg/l หรือการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 μM ร่วมกับ ascorbic acid ความเข้มข้น 100 mg/l มีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนให้สูงขึ้น

Hiei and Komari (1997) ได้ทดลองย้ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium* ในข้าวจาปอนิคา 3 สายพันธุ์ คือ Tsukinchikari Asanohikari และ Koshihikari โดยศึกษาผลของสภาวะในการเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับเซลล์พืช ชนิดของเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ของ *Agrobacterium* และชนิดของเวกเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย้ายยีน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อพืช คือ การเลี้ยงในอาหารมี acetosyringone ที่อุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส หากไม่เลี้ยงในสภาวะดังกล่าวจะทำให้การย้ายยีนไม่ประสบผลสำเร็จ

Lutfor *et al.* (2000) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์หญ้าญี่ปุ่น(*Zoysia japonica* Steud.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ *Agrobacterium* ที่ต่างสายพันธุ์ ความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ต่างกัน พบว่า หลังจากพืชถูกถ่ายยีนไปแล้ว 24 ชั่วโมง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pIG121) สามารถตรวจสอบยีน *GUS* ในหญ้าได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เหมาะในการเพาะเลี้ยงหลังจากมีการย้ายยีนของ *Agrobacterium tumefaciens* ควรมีส่วนประกอบของ acetosyringone 50 µM

Sheikholeslam *et al.* (1987) ได้ศึกษาพบว่า acetosyringone ส่งเสริมให้การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ใน *Arabidopsis thaliana* มีประสิทธิภาพสูง โดยอัตราของการถ่ายยีนอยู่ระหว่าง 55-63% เมื่อมีการเติม acetosyringone ในระหว่างการปลูกเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการเติม acetosyringone ในระหว่างการปลูกเชื้อ อัตราการถ่ายยีนจะมีเพียง 2-3% เท่านั้น

Sharan and Weeks (2004) ได้ศึกษาการปรับปรุงการถ่ายยีนในข้าว 2 สายพันธุ์ ( HKR-46 และ HKR-126) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA2301 พบว่า การเติม acetosyringone ความเข้มข้นสูง 400 µM ในอาหารระหว่างการเลี้ยงเชื้อร่วมกับแคลลัสข้าว มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับความสำเร็จในการถ่ายยีน

Mahadtanapuk *et al.* (2006) ได้ทำการถ่ายยีนในปทุมมา โดยใช้ tretarded shoots เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มี pCAMBIA 121 หรือ 121-*Ca-ACSI* เป็นเวลา 30 นาที นำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 2 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วย้ายชิ้นส่วนเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l, IMA 4 mg/l, TDZ 0.5 mg/l, kanamycin 50 mg/l และ vancomycin 500 mg/l ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA 0.1 mg/l และ kanamycin 50 mg/l ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการถ่ายยีนโดยวิธี PCR ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และวิธี Southern blot พบว่า ภายหลัง 3 เดือน ที่พืชได้รับการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนได้ 14 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# อุปกรณ์และวิธีการ

## วัสดุและอุปกรณ์

1. ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ
2. เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มี พลาสมิด pCAMBIA 2301 ซึ่งมียีน phosphotransferase gene(*NPT II*) เป็นยีนเครื่องหมายและยีน $\beta$-glucuronidase (*GUS*) เป็นยีนรายงานผล ที่วัดค่า $OD_{600}$ ได้ 0.60
3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่
   - สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (1962) ( ตารางภาคผนวกที่ 1 )
   - สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ TDZ และ BA
   - แอลกอฮอล์ 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์β
   - อะซิโตไซลิงโกน (acetosyringone)
   - สารปฏิชีวนะ cefotaxime และ kanamycin
   - สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบยีน *GUS* ( ตารางภาคผนวกที่ 2 และ 3)
4. เครื่องแก้ว เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
   - บีกเกอร์
   - ปีเปตต์
   - แท่งแก้วคน
   - กระบอกตวง
   - ปากคีบ
   - ถุงพลาสติก
   - หนังยาง
   - ตู้ปลอดเชื้อ (lamina flow)
   - หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
   - กล้องดิจิตรอน
   - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
   - ขวดรูปชมพู่
   - ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมฝาปิด
   - จานแก้ว (plate)
   - มีดผ่าตัด
   - อะลูมิเนียมฟอย
   - กระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
   - ตะเกียงแอลกอฮอล์
   - ไมโครปีเปตต์ และทิปขนาดต่างๆ
   - เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด
   - นาฬิกาจับเวลา
   - ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ±3 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอด Cool White 16 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีการ

**1. การเตรียมชิ้นส่วนของหน่อปทุมมา**

นำหน่อปทุมมาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาลอกเอาส่วนของกาบใบออกให้หมดให้เหลือเฉพาะหน่อที่อยู่บริเวณโคนต้น แล้วตัดให้หน่อมีขนาด 0.5 cm.

**2. การทดสอบความเข้มข้นของสารกระตุ้น acetosyringone ในการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา**

2.1.การปลูกเชื้อ (inoculation) นำชิ้นส่วนปทุมมาที่เตรียมไว้มาเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium* ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 2301 วัดค่า $OD_{600}$ ได้ 0.60 ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300 µM เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนมาซับบนกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในจานแก้ว เพื่อเป็นการขจัดเชื้อออกบางส่วน

2.2. การบ่มเชื้อ (co-cutivation) ย้ายชิ้นส่วนลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และเติม acetosyringone ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300 µM เป็นเวลา 3 วัน โดยบ่มไว้ในห้องเพาะเลี้ยง ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับมืด 8 ชั่วโมง

2.3. เมื่อครบ 3 วันนำเอาชิ้นส่วนมาล้างเชื้อ *Agrobacterium* ออกในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม cefotaxime 500 mg/l จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.4. ย้ายชิ้นส่วนมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l และ cefotaxime 250 mg/l นำไปบ่มไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับมืด 8 ชั่วโมง ย้ายชิ้นส่วนเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนทุก ๆ สัปดาห์ และทำการบันทึกผลการทดลอง

**3. การบันทึกผลการทดลองและคำนวณเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนของแต่ละชิ้นส่วน**

- ความสูงของหน่อเก่า
- จำนวนราก
- ความยาวราก
- จำนวนใบ
- จำนวนหน่อใหม่
- ความสูงของหน่อใหม่
- คำนวณเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4. การตรวจสอบผลการทดลอง**

ตรวจสอบผลการทดลอง โดยวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* นำใบปทุมมาบางส่วนแช่ในสารละลาย X- gluc (5–bromo–4–chloro–3–indolyl glucuronide) (ตารางภาคผนวกที่ 2 และ3) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบที่ได้ไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อขจัดคลอโรฟิลล์ออก ใบที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* จะสร้างเอนไซม์ $\beta$-glucuronidase แล้วเปลี่ยน X- gluc ให้ได้สีน้ำเงิน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลการทดลอง

### การเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาบนอาหารคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

**ความสูงหน่อเริ่มต้น**

ความสูงหน่อเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) พบว่าหน่อเริ่มต้นมีความยืดยาวสูงขึ้น ความสูงของหน่อเริ่มต้นในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยหน่อที่สูงที่สุด คือ หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone ซึ่งมีความสูงเฉลี่ยของหน่อเท่ากับ 2.76 cm. ( ตารางที่ 1) หน่อที่มีความสูงน้อยที่สุด มีความสูงเฉลี่ยอยู่ที่ 2.30 cm. คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 µM ส่วนหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ความเข้มข้น 50 , 100 และ 300 µM มีความสูงของหน่อเฉลี่ยเท่ากับ 2.46 , 2.51 และ 2.38 cm. ตามลำดับ

**จำนวนราก**

จำนวนรากที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) พบว่าจำนวนรากที่เกิดขึ้นนั้นยังมีไม่มาก โดยลักษณะของรากจะเห็นเป็นปุ่มสีขาว ๆ เกิดขึ้นบริเวณโคนหน่อ จำนวนรากที่เกิดขึ้นมาใหม่ในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หน่อปทุมมาที่มีรากเกิดขึ้นมากที่สุด ได้แก่ หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 µM ซึ่งมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.65 ราก ( ตารางที่ 1) รองลงมา คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 และ 300 µM มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากันอยู่ที่ 0.50 ราก ส่วนหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone และหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50 µM มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.35 และ 0.25 ราก ตามลำดับ

**ความยาวราก**

ความยาวรากของหน่อปทุมมาในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301 ) พบว่าความยาวของรากที่เกิดขึ้นมีความยาวเพียงเล็กน้อย ความยาวของรากในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยหน่อปทุมมาที่มีความยาวรากมากที่สุด คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone ซึ่งมีความยาวรากเฉลี่ยอยู่ที่ 0.24 cm. (ตารางที่ 1) ส่วนหน่อที่มีความยาวรากน้อยที่สุด คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ความเข้มข้น 50 และ 300 µM มีความยาวราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉลี่ยเท่ากันอยู่ที่ 0.15 cm. หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 μM มีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.17 และ 0.21 cm. ตามลำดับ

**จำนวนใบ**

ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ไปแล้ว 4 สัปดาห์ จึงเริ่มมีใบสีเขียวอ่อนปรากฏให้เห็น มีบางใบที่ยังม้วนอยู่และยังคลี่ออกไม่หมด จำนวนใบของหน่อปทุมมาที่เกิดขึ้นนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone และหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50 μM มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากันอยู่ที่ 1.00 ใบ (ตารางที่ 1) หน่อปทุมมาที่หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 μM มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากัน คือ 1.05 ใบ

**จำนวนหน่อใหม่**

หน่อใหม่ของปทุมมาจะปรากฏให้เห็นภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ไปแล้ว 4 สัปดาห์ ลักษณะของหน่อใหม่ที่เกิดขึ้นนี้ จะเห็นเป็นหน่อสีขาวและเขียวใส ขนาดเล็ก อยู่ที่บริเวณโคนของหน่อเริ่มต้น จำนวนหน่อใหม่ที่เกิดขึ้นในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone มีความแตกต่างกันทางสถิติ พบว่า หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50 และ 300 μM ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ยังไม่มีหน่อใหม่ปรากฏให้เห็น (ตารางที่ 1)หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 และ 200 μM มีจำนวนหน่อใหม่เกิดขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.15 และ 0.10 หน่อ ตามลำดับ

**ความสูงหน่อใหม่**

ความสูงของหน่อใหม่ที่เกิดขึ้น ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ไปแล้ว 4 สัปดาห์ พบว่ายังมีความสูงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 และ 200 μM มีความสูงของหน่อใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 0.04 และ 0.03 cm. ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 1** แสดงการเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของสารกระตุ้น acetosyringone ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมาภายหลังการถ่ายยีน 4 สัปดาห์

| ความเข้มข้น Acetosyringone (µM) | หน่อเริ่มต้น (±SE) | | | | หน่อใหม่ (±SE) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ความสูงหน่อ (cm.) | จำนวนราก (ราก) | ความยาวราก (cm.) | จำนวนใบ (ใบ) | จำนวนหน่อ 1/ (หน่อ) | ความสูงหน่อ 1/ (cm.) |
| 0 | 2.76 ± 0.24 | 0.35 ± 0.10 | 0.24 ± 0.10 | 1.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00b | 0.00 ± 0.00b |
| 50 | 2.46 ± 0.17 | 0.25 ± 0.05 | 0.15 ± 0.10 | 1.00 ± 0.12 | 0.00 ± 0.00b | 0.00 ± 0.00b |
| 100 | 2.51 ± 0.14 | 0.50 ± 0.13 | 0.17 ± 0.04 | 1.05 ± 0.05 | 0.15 ± 0.05a | 0.04 ±0.01a |
| 200 | 2.30 ± 0.07 | 0.65 ± 0.17 | 0.21 ± 0.04 | 1.05 ± 0.05 | 0.10 ± 0.06ab | 0.03 ± 0.02ab |
| 300 | 2.38 ± 0.10 | 0.50 ± 0.17 | 0.15 ± 0.05 | 1.05 ± 0.05 | 0.00 ± 0.00b | 0.00 ± 0.00b |
| F - test | ns | ns | ns | ns | * | * |
| CV % | 12.64 % | 58.79 % | 65.31 % | 12.53 % | 136.63 % | 145.93 % |

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในวิธี Duncan'sNew Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาบนอาหารคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีน เป็นเวลา 8 สัปดาห์**

ลักษณะการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาในสัปดาห์ที่ 8 ยังมีลักษณะการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่1)

**ความสูงหน่อเริ่มต้น**

ความสูงหน่อเก่าในสัปดาห์ที่ 8 ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) พบว่า หน่อเริ่มต้นมีความสูงเพิ่มขึ้น แต่ความสูงของหน่อเริ่มต้นในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ยังคงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยหน่อที่มีความสูงมากที่สุด คือ หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่การเติม acetosyringone ซึ่งมีความสูงเฉลี่ยของหน่อเท่ากับ 3.01 cm. ( ตารางที่ 2) ส่วนหน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 300 μM มีความสูงหน่อเฉลี่ยอยู่ที่ 2.62, 3.15, 2.71 และ 2.58 cm. ตามลำดับ

**จำนวนราก**

จำนวนรากที่เกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 8 ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) พบว่า จำนวนรากของหน่อปทุมมา มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นในทุก ๆ ความเข้มข้นของ acetosyringone จำนวนรากนี้ยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยหน่อปทุมมาที่มีจำนวนของรากมากที่สุด คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.95 ราก (ตารางที่ 2) ส่วนจำนวนรากของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วม แต่ไม่มีการเติม acetosyringone และหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50, 100 และ 300 μM มีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 0.50, 0.50, 0.70 และ 0.75 ราก ตามลำดับ

**ความยาวราก**

ความยาวรากของหน่อปทุมมาในสัปดาห์ที่ 8 ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) พบว่า รากมีความยาวเพิ่มขึ้น ความยาวรากในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ยังคงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยความยาวรากของหน่อปทุมมาที่มีความยาวมากที่สุด คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ แต่ไม่มีการเติม acetosyringone ซึ่งมีความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 1.24 cm. (ตารางที่ 2) ส่วนรากของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50 , 100 , 200 และ 300 μM มีความยาวรากเฉลี่ยอยู่ที่ 0.22, 0.23 , 0.34 และ 0.19 cm. ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

82128

**จำนวนใบ**

ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ไปแล้ว 8 สัปดาห์ มีใบสีเขียวอ่อน และบางใบมีสีเขียวเข้มขึ้น มีบางใบที่ยังม้วนอยู่ และยังคลี่ออกไม่หมด แต่จำนวนใบที่เกิดขึ้นในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone นั้นยังคงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หน่อปทุมมาที่มีจำนวนใบเกิดขึ้นมากที่สุด คือ หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ แต่ไม่มีการเติม acetosyringone มีจำนวนใบเฉลี่ยอยู่ที่ 1.47 ใบ (ตารางที่ 2) หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 300 μM มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 1.15, 1.40, 1.35 และ 1.25 ใบ ตามลำดับ

**จำนวนหน่อใหม่**

หน่อใหม่ของปทุมมาภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ไปแล้ว 8 สัปดาห์ มีเขียวเข้มขึ้น เห็นชัดเจนกว่าสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 1) จำนวนหน่อใหม่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยพบว่าหน่อปทุมมาที่หน่อที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ แต่ไม่มีการเติม acetosyringone ไม่มีจำนวนของหน่อใหม่เกิดขึ้น (ตารางที่ 2 ) หน่อปทุมมาที่มีจำนวนหน่อใหม่มากที่สุด คือ หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 μM มีจำนวนหน่อใหม่เฉลี่ยอยู่ที่ 0.35 หน่อ ส่วนหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อ และบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50, 200 และ 300 μM มีจำนวนหน่อใหม่เกิดขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.20, 0.30 และ 0.15 หน่อ ตามลำดับ

**ความสูงหน่อใหม่**

ความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาที่เกิดขึ้น ภายหลังการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ไปแล้ว 8 สัปดาห์ พบว่ามีความสูงเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 โดยหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 μM มีความสูงของหน่อใหม่มากที่สุด ซึ่งมีความสูงของหน่อใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 0.19 cm. (ตารางที่ 2) ส่วนหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50, 200 และ 300 μM มีความสูงของหน่อใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 0.07, 0.16 และ 0.07 cm. ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาพที่ 1** ลักษณะการเจริญเติบโตหน่อเริ่มต้น และลักษณะหน่อใหม่ของปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 µM และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2** แสดงการเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของสารกระตุ้น acetosyringone ต่อการเจริญเติบโตของปทุมมาภายหลังการถ่ายยีน 8 สัปดาห์

| ความเข้มข้น Acetosyringone (μM) | หน่อเริ่มต้น (±SE) | | | | หน่อใหม่ (±SE) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ความสูงหน่อ (cm.) | จำนวนราก (ราก) | ความยาวราก (cm.) | จำนวนใบ (ใบ) | จำนวนหน่อ[1/] (หน่อ) | ความสูงหน่อ[1/] (cm.) |
| 0 | 3.01 ± 0.25 | 0.50 ± 0.10 | 0.43 ± 0.12 | 1.47 ± 0.05 | 0.00 ± 0.00a | 0.00 ± 0.00a |
| 50 | 2.62 ± 0.26 | 0.50 ± 0.13 | 0.22 ± 0.05 | 1.15 ± 0.10 | 0.20 ± 0.14a | 0.07 ± 0.04ab |
| 100 | 3.15 ± 0.07 | 0.70 ± 0.10 | 0.23 ± 0.04 | 1.40 ± 0.14 | 0.35 ± 0.05ab | 0.19 ± 0.04bc |
| 200 | 2.71 ± 0.04 | 0.95 ± 0.15 | 0.34 ± 0.11 | 1.35 ± 0.10 | 0.30 ± 0.06ab | 0.16 ± 0.04bc |
| 300 | 2.58 ± 0.08 | 0.75 ± 0.17 | 0.19 ± 0.06 | 1.25 ± 0.17 | 0.15 ± 0.05b | 0.07 ± 0.03b |
| F - test | ns | ns | ns | ns | * | * |
| CV % | 12.06 % | 39.09 % | 58.96 % | 17.83 % | 75.28 % | 76.03 % |

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบในวิธี Duncan'sNew Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS***

จากการทดสอบการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการคัดเลือกต้นโดยใช้อาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 100 mg/l พบว่า หน่อปทุมมาที่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญได้บนอาหารคัดเลือกเท่ากัน 15 เปอร์เซ็นต์ คือ หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 50, 200 และ 300 μM ส่วนหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 μM มีเปอร์เซ็นต์การเจริญได้บนอาหารคัดเลือก 5 เปอร์เซ็นต์ แต่หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ แต่ไม่มีการเติม acetosyringone ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 3)

จากนั้นนำชิ้นส่วนใบของหน่อปทุมมา ที่สามารถเจริญขึ้นมาได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยวิธี GUS assay พบว่า ชิ้นส่วนใบของปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM มีการแสดงออกของยีน *GUS* มากที่สุด (ภาพที่ 2) ซึ่งจากการนำชิ้นส่วนของใบมาทดสอบ 3 ชิ้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *GUS* ทั้ง 3 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

เมื่อนำรากของหน่อปทุมมาที่สามารถเจริญขึ้นมาได้บนอาหารคัดเลือก มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยวิธี GUS assay พบว่า ที่รากมีการแสดงออกของยีน *GUS* (ภาพที่ 3) โดยสังเกตเห็นว่าจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนรากชัดเจนกว่าจุดสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นบนใบ แต่การแสดงออกของยีน *GUS* บนรากเกิดขึ้นทั้งบนรากของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone และรากของหน่อปทุมมาที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ จึงไม่สามารถนำผลที่ได้ในรากมาตรวจสอบผลการถ่ายยีน

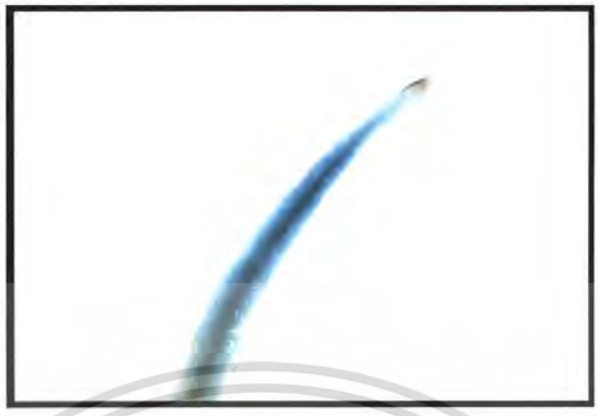
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3** แสดงผลการถ่ายยีน (pCAMBIA 2301) ในปทุมมาโดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105

| ความเข้มข้นของ acetosyringone (µM/l) | จำนวนหน่อเริ่มต้น (หน่อ) | จำนวนหน่อที่สามารถเจริญได้ (หน่อ) | เปอร์เซ็นต์หน่อที่เจริญได้ (%) | จำนวนใบเริ่มต้น (ใบ) | จำนวนใบที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* (ใบ) | เปอร์เซ็นต์การถ่ายยีน (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 20 | 3 | 15 | 3 | 0 | 0 |
| 100 | 20 | 1 | 5 | 1 | 1 | 5 |
| 200 | 20 | 3 | 15 | 3 | 3 | 15 |
| 300 | 20 | 3 | 15 | 3 | 2 | 10 |

**ภาพที่ 2** การแสดงออกของยีน *GUS* บนใบของปทุมมาที่ ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 µM และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่ 3** การแสดงออกของยีน *GUS* บนรากของปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 µM และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 μM แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3.0 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ หน่อปทุมมามีการเจริญเติบโตทั้งทางด้านความสูงหน่อเริ่มต้น จำนวนราก ความยาวราก และจำนวนใบ ในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนจำนวนหน่อใหม่ ความสูงหน่อใหม่ที่เกิดขึ้น พบว่า หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีหน่อใหม่เกิดขึ้น ส่วนหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ แต่ไม่มีการเติม acetosyringone ไม่มีหน่อใหม่เกิดขึ้น และยังพบอีกว่า หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อแต่ไม่มีการเติม acetosyringone นี้ได้ตายไปก่อนที่จะมีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* อาจเนื่องมาจากหน่อปทุมมาไม่ได้รับการถ่ายยีนทำให้ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกได้

เมื่อนำใบของหน่อปทุมมาที่สามารถเจริญขึ้นมาได้บนอาหาคัดเลือก ไปทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยดูจากการเกิดจุดสีน้ำเงินที่ปรากฏขึ้นบนชิ้นส่วนของใบ พบว่า ใบของหน่อปทุมมาที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *GUS* คือ ใบของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 50 μM ส่วนหน่อปทุมมาที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* มากที่สุด คือ หน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้น 200 μM ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Holford *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลระหว่างการถ่ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ C58 และ A281 ในลิ้นมังกร (*Antirrhinum majus*) พบว่า ที่สภาวะที่มีการเติม acetosyringone 200 μM และ pH 5.2 มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด 51% และยังสอดคล้องกับงานทดลองของ Lee *et al.* (2006) ที่มีการศึกษาการเติม acetosyringoneในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ร่วมกับแคลลัสของหญ้า พบว่า ความเข้มข้นของ acetosyringone 200 μM มีผลทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *GUS* สูงสุดถึง 56.1% และยังพบอีกว่า เมื่อนำรากของหน่อปทุมมาที่สามารถเจริญขึ้นมาได้บนอาหาคัดเลือก ไปทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยวิธี GUS assay พบว่า ที่รากมีการแสดงออกของยีน *GUS* ที่สามารถเห็นได้ชัดเจนกว่าการแสดงออกของยีน *GUS* ที่ใบ อาจเนื่องมาจากการมีความจำเพาะเจาะจงของบริเวณเนื้อเยื่อในการแสดงออกของยีน *GUS* ซึ่งได้มีการรายงานไว้ในการทดลองของ Koyama et al. (2005) ได้ทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปร-โมเตอร์ PHT1 ใน *Arabidopsis* และในข้าว ที่ใช้ยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล ถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ พบว่า ที่ใบมีการแสดงออกของยีน *GUS* ได้ในปริมาณที่น้อย แต่มีการแสดงออกได้ดีในราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *GUS* ในรากของปทุมมานั้น มีการแสดงออกของยีน *GUS* ทั้งในรากของปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone และรากของปทุมมาที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone จึงควรมีการศึกษาหาสาเหตุในลำดับต่อไป และไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความสำเร็จของการถ่ายยีนครั้งนี้ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองผลของสารกระตุ้น acetosyringone ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l TDZ 0.5 mg/l และยาปฏิชีวนะ kanamycin 100 mg/l พบว่า การเจริญเติบโตของหน่อเริมต้น ทางด้านความสูงหน่อ จำนวนราก ความยาวราก และจำนวนใบ ในแต่ละความเข้มข้นของ acetosyringone ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนหน่อปทุมมาที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อ แต่ไม่มีการเติม acetosyringone ไม่มีหน่อใหม่เกิดขึ้น ในขณะที่หน่อปทุมมาที่ไดรับการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อร่วมกับการเติม acetosyringone ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีหน่อใหม่เกิดขึ้น และความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ช่วยให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมีมากที่สุด คือ acetosyringone 200 µM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง


กรมวิชาการเกษตร. 2545. เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับปทุมมา. กรุงเทพฯ:ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

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

เทิดศักดิ์ ประถมวงศ์ และ ธำรง เงาภู่ทอง. 2544. การย้ายยีนในข้าวเหนียวโดยใช้อโกรแบคทีเรียม. ปริญญานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมฯ.

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

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

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

วิจิตตรา โหราเรือง, กนกวรรณ รมยานนท์, มัณฑนา บุญธรรม, Stanislaw Flasinski และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2547. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร. กรุงเทพฯ. น. 515-520.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2543. สัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ครั้งที่ 13. กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

สุปราณี วนิชชานนท์. 2540. คู่มือการปลูกไม้ตัดดอก. สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร. นนทบุรี. น. 95-140.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2537. ปทุมมาและกระเจียว. ใน : กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ (บรรณาธิการ) ไม้ดอกไม้ประดับเขตร้อน. กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. น.59-71.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กทม. น. 184-204.


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. กรมส่งเสริมการเกษตร กลุ่มส่งเสริมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. กรุงทพฯ.

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

Holford, P., Hernandez, N. and Newbury, H.J., 1992. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 11: p. 196-199.

Koyama, T., Ono, T., Shimizu, M., Jin, B., Mizuno, R., Tomita, K., Mitsukawa, N., Kawazu, T., Kimura, T., Ohmiya, K. and Sakka, K. 2005. Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root-specific expression of transgene in rice. Journal of Bioscience and Bioengineering. 99: p. 38-42.

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*-mediaed transformation of seed-derived callus tissues. Plant Sci.171: p. 408-414.

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

Godwin, I., Ford-Lloyd, B., and Newbury, H., J., 1991. The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Rep. 96: p. 71-75.

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

Saharan, V., Yadav, R.C., Yadav, N.R. and Ram, K., 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediaed transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa* L.) African Journal Biotec. 3: p. 572-575.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

**ตารางภาคผนวกที่ 1** อาหารสูตร MS (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

**สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย X- gluc**

**ตารางภาคผนวกที่ 2** สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 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 frrrocyanide | 50 | 4.2239 |
| 0.2 M $Na_2EDTA$ | 10 | 3.7224 |

**ตารางภาคผนวกที่ 3** สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย buffer

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 4** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.4837 | 0.1209 | $1.23^{ns}$ | 3.06 | 4.89 | 0.3400 |
| Error | 15 | 1.4756 | 0.0984 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 1.9593 | 0.1031 | | | | |

Grand Mean = 2.4805 CV. = 12.6443 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**ตารางภาคผนวกที่ 5** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อความสูงหน่อเริ่มต้นของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 1.0355 | 0.2589 | $2.25^{ns}$ | 3.06 | 4.89 | 0.1121 |
| Error | 15 | 1.7270 | 0.1151 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 2.7625 | 0.1454 | | | | |

Grand Mean = 2.8140 CV. = 12.0580 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 6** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อเมื่ออายุ 4 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.3800 | 0.0950 | 1.36 ns | 3.06 | 4.89 | 0.2948 |
| Error | 15 | 1.0500 | 0.0700 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 1.4300 | 0.0753 | | | | |

Grand Mean = 0.4500 CV. = 58.7945 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**ตารางภาคผนวกที่ 7** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อจำนวนรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.5720 | 0.1430 | 2.02 ns | 3.06 | 4.89 | 0.1422 |
| Error | 15 | 1.0600 | 0.0707 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 1.6320 | 0.0859 | | | | |

Grand Mean = 0.6800 CV. = 39.0929 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 8** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.0245 | 0.0061 | 0.42 ns | 3.06 | 4.89 | 0.7948 |
| Error | 15 | 0.2202 | 0.0147 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.2447 | 0.0129 | | | | |

Grand Mean = 0.1854 CV. = 65.3122 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**ตารางภาคผนวกที่ 9** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อความยาวรากของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.1561 | 0.0390 | 1.41 ns | 3.06 | 4.89 | 0.2775 |
| Error | 15 | 0.4146 | 0.0276 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.5707 | 0.0300 | | | | |

Grand Mean = 0.2819 CV. = 58.9585 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 10** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.0120 | 0.0030 | 0.18 ns | 3.06 | 4.89 | 0.9432 |
| Error | 15 | 0.2500 | 0.0167 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.2620 | 0.0138 | | | | |

Grand Mean = 1.030 CV. = 12.5339 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

**ตารางภาคผนวกที่ 11** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อจำนวนใบของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.2600 | 0.0650 | 1.16 ns | 3.06 | 4.89 | 0.3658 |
| Error | 15 | 0.8375 | 0.0558 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 1.0975 | 0.0578 | | | | |

Grand Mean = 1.3250 CV. = 17.8333 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 12** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อจำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.0800 | 0.0200 | 4.29* | 3.06 | 4.89 | 0.0164 |
| Error | 15 | 0.0700 | 0.0047 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.1500 | 0.0079 | | | | |

Grand Mean = 5.0000 CV. = 136.6260

%

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

**ตารางภาคผนวกที่ 13** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อจำนวนหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.3000 | 0.0750 | 3.31* | 3.06 | 4.89 | 0.0389 |
| Error | 15 | 0.3400 | 0.0227 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.6400 | 0.0337 | | | | |

Grand Mean = 0.2000 CV. = 75.2773 %

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ 14** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.0045 | 0.0011 | 3.68* | 3.06 | 4.89 | 0.0276 |
| Error | 15 | 0.0046 | 0.0003 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.0091 | 0.0005 | | | | |

Grand Mean = 1.1999 CV. = 145.9325 %

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

**ตารางภาคผนวกที่ 15** ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ ผลของความเข้มข้น acetosyringone ต่อความสูงหน่อใหม่ของปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

| source | DF | Sum of Square | Mean Square | F-value | F 0.05 | F 0.01 | F-Prob |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 4 | 0.0902 | 0.0226 | 4.28* | 3.06 | 4.89 | 0.0165 |
| Error | 15 | 0.0791 | 0.0053 | | | | |
| Corrected Total | 19 | 0.1693 | 0.0089 | | | | |

Grand Mean = 9.5500 CV. = 76.0275 %

* มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้