21909
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin ของเนื้อเยื่อปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Antibiotic Kanamycin Resistance Detection of *Curcuma alismatifolia*

T098532

โดย

นางสาว ชญานิศ ศิรินภาดล

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.กัญจนา แซ่เตียว

ปพ.
ช112ก
2550
เลขหมู่ ปพ.2
เลขทะเบียน 98532
วัน,เดือน,ปี

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(พืชสวน)

พุทธศักราช 2550

.b 11795426
.i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin ของเนื้อเยื่อปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ

โดย : นางสาวชญานิศ ศิรินภาดล
สาขาวิชา : พืชสวน
ภาควิชา : พืชสวน
คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในปทุมมา *Curcuma alismatifolia* โดยใช้หน่อของปทุมมาขนาด 3 – 5 มิลลิเมตรทดสอบบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 0-200 มิลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า อาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ 4.75 คะแนน มีจำนวนการเกิดหน่อมากที่สุด คือ 3.8333 หน่อ และ จำนวนรากมากที่สุด คือ 6.6667 ราก เนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงชิ้นส่วนของปทุมมา ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนปทุมมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	: *In Vitro* Antibiotic Kanamycin Resistance Detection of *Curcuma alismatifolia*
By	: Miss Chayanit Sirinapadol
Major	: Horticulture
Department	: Horticulture
Faculty	: Agricultural Technology
Advisor	: Dr. Kanjana Saetiew

Abstract

The kanamycin concentration was tested to affect the growth of Patumma for transgenic plant selection. Shoots of *C. alimatifolia* cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3 mg/L BA were cut into size 3-5 mm. The explants were cultured on the same medium supplemented with 0-200 mg/L kanamycin in 8 weeks. It was found that 4.7500 score, 3.8333 shoots and 6.6667 roots were regenerated on medium with out kanamycin and kanamycin at 100 mg/L was the lowest concentration that could eliminate all explants in 8 weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ดร. กัญจนา แซ่เตียว ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง ให้คำปรึกษา ในการทำการทดลองตั้งแต่แรกเริ่ม ตลอดจนตรวจแก้ไขสิ่งบกพร่องต่าง ๆ จนปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ พี่นักศึกษาปริญญาโททุกท่าน และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยให้คำแนะนำและปรึกษาปัญหาต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้การศึกษาและอำนวยสถานที่ อุปกรณ์ในการปฏิบัติงานทดลอง

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว และเพื่อน ๆ ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือด้วยดีมาโดยตลอด

นางสาวชญานิศ ศิรินภาดล

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
สารบัญตารางภาคผนวก	ค
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	8
ผลการทดลอง	13
วิจารณ์ผลการทดลอง	20
สรุปผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงใน อาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์ 16

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนหน่อของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์ 17

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนรากของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	11
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะหน่อที่เกิดขึ้นใหม่ที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	12
ภาพที่ 3 แสดงการเกิดรากที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	12
ภาพที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆในเวลา 8 สัปดาห์	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

1. ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962) 24
2. การวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงใน อาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 4 25
3. การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนหน่อของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 4 25
4. การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนรากของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 4 26
5. การวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงใน อาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8 26
6. การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนหน่อชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหารMS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8 27
7. การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนรากชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปทุมมา เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลำต้นสะสมอาหารอยู่ใต้ดินแบบเหง้า ดอกปทุมมามีรูปทรงสง่าและมีสีสันสวยงาม เป็นที่ประทับใจแก่ผู้ที่ได้พบเห็น จนได้รับการส่งเสริมให้เป็นไม้ตัดดอกและเก็บหัวพันธุ์เพื่อส่งไปขายยังต่างประเทศ เป็นที่ประทับใจและชื่นชอบของชาวต่างประเทศจนได้สมญาว่า สยามทิวลิป (Siam Tulip) (ทวีพงศ์, 2548) ปทุมมาเป็นพืชที่มีศักยภาพในการส่งออกสามารถทำรายได้ให้กับประเทศหลายล้านบาท และมีแนวโน้มในการส่งออกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่และพันธุ์ที่ปราศจากโรค วิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช คือ การถ่ายยีน

ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชจะต้องถ่ายยีนที่ต้องการและถ่ายยีนคัดเลือก (Selectable marker gene)ให้กับพืช ยีนที่ใช้คัดเลือกส่วนใหญ่จะเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะซึ่งในการทดลงครั้งนี้เป็นการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปทุมมาเพื่อที่จะนำไปใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชต่อไปในอนาคต

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปทุมมา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma alismatifolia*

วงศ์ Zingiberaceae

สกุล Curcuma

ลำต้นและใบ

ปทุมมามีลำต้นใต้ดิน หรือที่เรียกว่าเหง้า เหง้าปทุมมามีการแตกแขนงเช่นเดียวกับขิงหรือข่า แต่มีลักษณะป้อมและโป่งออกด้านข้าง เห็นข้อปล้องชัดเจน และมีตาเรียงตัวในแนวเดียวกัน 3-4 ตา ลำต้นปทุมมาที่เห็นแท้จริงแล้วคือ ลำต้นเทียม มีลักษณะเป็นกาบ ทำหน้าที่เป็นก้านใบและห่อหุ้มส่วนก้านดอก ความสูงของต้นจากโคลนถึงยอดสุดประมาณ 50 เซนติเมตร เมื่อต้นเริ่มแก่ส่วนโคนลำต้นใต้ดินจะโป่งออกทางด้านข้างและกลายเป็นหัว

ใบเป็นใบเดี่ยว มีแผ่นใบยาวเรียว สีเขียว เส้นกลางใบมีสีน้ำตาลเรื่อ ขอบใบเรียบ ใบกว้าง 4-5เซนติเมตร ยาว 30-35 เซนติเมตร

ดอก

ปทุมมาออกดอกที่ปลายยอดลำต้นเทียม ช่อดอกประกอบด้วยกลีบประดับเรียงซ้อนกันเป็นระเบียบ กลีบประดับล่างและบนมีลักษณะและสีสันแตกต่างกัน โคนกลีบประดับเชื่อมต่อกัน ตรงปลายแผ่ออกเป็นช่อง ทำให้น้ำขังได้ กลีบประดับส่วนล่างมี 8-10 กลีบ สั้นและมีสีเขียว กลีบประดับส่วนบนมีขนาดใหญ่ มีสีม่วงอมชมพู เรียงซ้อนกันคล้ายดอกบัว โดยทั่วไปมี 12-15 กลีบ

ดอกจริงอยู่ตรงบริเวณซอกกลีบประดับส่วนล่าง และบางส่วนของกลีบประดับส่วนบน ดอกจริงมีประมาณ 3-4 ดอก ต่อกลีบประดับ โดยทยอยบานทีละดอกและบานเพียง 1 วัน ดอกจริงมีความยาว 4 เซนติเมตร มี 6 กลีบ แบ่งเป็นชั้นนอก 3 กลีบ และชั้นใน 3 กลีบ

กลีบดอกมีสีขาว กลีบดอกด้านล่างที่มีลักษณะเหมือนปากมีสีม่วงเรื่อและเหลือง ดอกปทุมมาเป็น ดอกสมบูรณ์เพศเกสรตัวผู้ประกอบด้วยก้านเกสรซึ่งแผ่เชื่อมติดกับกลีบดอก ปลายก้านชูมีอับละอองเกสร 2 พู มีฐานอับละอองเชื่อมติดกันเป็นหลอดล้อมก้านชูเกสรตัวเมีย(ทวีพงศ์, 2548)

ราก

รากของพืชสกุลนี้เป็นระบบรากฝอยรากส่วนหนึ่งมีปลายบวมพองออกมีลักษณะเป็นตุ้มทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร ไม่สามารถตัดไปใช้ขยายพันธุ์ได้ ปกติตุ้มรากนี้จะเกิดขึ้นเป็นปริมาณมากเมื่อต้นมีความสมบูรณ์เต็มที่ ดังนั้นจำนวนตุ้มรากต่อเหง้าจึงถูกนำมาใช้กำหนดคุณภาพหัวพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้ตุ้มรากจะค่อย ๆ เหี่ยวไปก่อนเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน โดยเหง้าเป็นส่วนที่เหี่ยวช้าที่สุด หัวพันธุ์ที่มีตุ้มรากมากจึงสามารถเก็บรักษาได้นาน และถึงแม้ว่าหัวพันธุ์ที่ไม่มีตุ้มรากหรือถูกตัดตุ้มรากทิ้งก่อนปลูกก็สามมารถงอกได้เช่นเดียวกับหัวพันธุ์ที่มีตุ้มราก (สุรวิช, 2539)

การปลูกและการดูแลรักษา

ปทุมมาเจริญเติบโตออกดอกในช่วงฤดูฝน หลังจากนั้นหัวพันธุ์จะพักตัวในช่วงฤดูหนาวราวเดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ เมื่อพ้นระยะพักตัวจึงงอกเป็นต้นใหม่ ซึ่งตรงกับฤดูฝนพอดี ปทุมมานี้ผู้ปลูกสามารถปลูกได้ตั้งแต่เดือนเมษายนเป็นต้นไป

ปทุมมาจะสร้างหัวใหม่เมื่อออกดอก ประมาณเดือนตุลาคมจะเริ่มเฉาในเดือนธันวาคมผู้ปลูกควรขุดหัวขึ้นมาเก็บรักษา(ทวีพงศ์, 2548)

การขยายพันธุ์

การเพาะเมล็ด

การผสมพันธุ์ไม้ดอกกลุ่มปทุมมาและกลุ่มกระเจียวจะกระทำ ได้ในช่วงเช้าของวันที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง ทั้งนี้เพราะดอกจะอยู่ในสภาพที่พร้อมกับการ ถ่ายละอองเกสรในช่วง 8-10 นาฬิกา และการที่เรณูของพืชสกุลนี้มีความเป็นหมันในระดับปานกลางค่อนข้างต่ำ สภาพอากาศที่แห้งจะทำ ให้เรณูเสียชีวิตหมดไปก่อนที่จะเกิดการปฏิสนธิขึ้น การสร้างความหลากหลายจากการผสมพันธุ์แล้วนำเมล็ดมาเพาะนั้นส่วนใหญ่จะใช้วิธีผสมข้าม ซึ่งจะต้องกำจัดเรณูออกก่อนการถ่ายละอองเกสร โดยใช้วัสดุปลายแหลมจำพวกปากคีบ เข็มเขี่ย หรือไม้จิ้มฟันปลายแหลม ขูดเรณูออกด้านบนสู่ด้านล่างของอับเรณู การขูดอับดังกล่าวจะไม่ทำ ให้อับเรณูกระดกขึ้นจนเรณูสัมผัสกับยอดเกสรตัวเมีย เพราะปกติอับเรณูจะกระดกขึ้นได้ตามกลไกลธรรมชาติที่ช่วยในการถ่ายละอองเกสร การถ่ายละอองเกสรสามารถกระทำได้ง่ายเพียงแต่นำเรณูซึ่งมีลักษณะคล้ายแป้งไปป้ายบนยอดเกสรตัวเมีย เมื่อถ่ายละอองเกสรแล้วควรตัดใบประดับที่รองดอกนั้นออก เพื่อป้องกันการขังของน้ำ ซึ่งอาจทำให้ผลเน่าและเพื่อสะดวกในการกำจัดดอกตูมที่เหลือของช่อดอกเดียวกัน นอกจากนี้ยังต้องแขวนป้ายระบุคู่ผสมและวันผสมได้ด้วยหากเกิดการปฏิสนธิขึ้นผลสีเขียวจะเจริญเติบโตขึ้นจากบริเวณใต้กลีบเลี้ยงเมื่อผลแก่จะมีสีเขียวอ่อนลงและเปลือกบางใสขึ้นจนพอจะเห็นสีดำของเมล็ดภายในควรเก็บเมล็ดแก่ไว้ก่อนที่ผลจะแตกจนเมล็ดหลุดร่วง เนื่องจากพืชสกุลนี้มีการพักตัวจึงควรนำเมล็ดมาเพาะในฤดูปลูกถัดไปโดยการเก็บเมล็ดไว้ในที่ร่มการเพาะเมล็ดควรเพาะในกระบะทรายผสมขี้เถ้าแกลบ (อัตราส่วน 1:1) โดยให้เมล็ดจมอยู่ใต้ผิววัสดุปลูกราว 0.5 - 1 เซนติเมตร การรดน้ำต้องกระทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เมล็ดกระเด็นเมล็ดจะทยอยงอกตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับของการพักตัวที่เหลืออยู่เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 3 - 4 ใบจึงค่อย ๆ แยกต้นกล้าไปปลูกในดินผสมด้วยระยะปลูก 10 x 10 เซนติเมตรจนออกดอกเพื่อคัดเลือกต่อไป

การเพาะเมล็ดควรเพาะในกระบะทรายผสมขี้เถ้าแกลบ (อัตราส่วน 1:1) โดยให้เมล็ดจมอยู่ใต้ผิววัสดุปลูกราว 0.5 - 1 เซนติเมตร การรดน้ำต้องกระทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เมล็ดกระเด็น เมล็ดจะทยอยงอกตามระดับของการพักตัวที่เหลืออยู่ เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 3 - 4 ใบจึงค่อย ๆ แยกต้นกล้าไปปลูกในดินผสมด้วยระยะปลูก 10 x 10 เซนติเมตรจนออกดอกเพื่อคัดเลือกต่อไป

การแยกเหง้า

ปกติผู้ปลูกเลี้ยงไม้ดอกสกุลนี้นิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีแยกเหง้าซึ่งจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนเดิมการขุดหัวของไม้ดอกสกุลนี้เมื่อสิ้นฤดูปลูกจะพบว่าแต่ละกอจะมีเหง้าหลายเหง้าเชื่อมติดกัน จึงควรแยกเหง้าเหล่านั้นออกจากกันก่อนที่จะนำเหง้าไปผึ่งและเก็บรักษา เพราะแผลจะไม่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายวิธีแยกเหง้าจะเพิ่มปริมาณได้ในอัตราเท่าไรจึงขึ้นกับขนาดของกอหากผู้ปลูกมีจำนวนเหง้าไม่เพียงพออาจนำเหง้าที่มีอยู่มาผ่านแบ่งตามความยาวเป็น 2 ชิ้น แต่ละชิ้นมีตาซึ่งอยู่ในสภาพดีติดอยู่ไม่น้อยกว่า 1 ตาซึ่งเมื่อผ่าเหง้าแบ่งแล้วจะต้องจุ่มชิ้นส่วนของเหง้าในสารละลายของยาป้องกันเชื้อรา เช่น แคปแทน ในอัตราที่ใช้ฉีดพ่นต้นไม้แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวไปผึ่งให้แห้งในที่ร่มก่อนปลูก วิธีนี้จะทำให้เพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ได้อีกเท่าตัวแต่การผ่าเหง้านี้จะต้องดูแลต้นไม้มากกว่าปกติด้วย เพราะต้นที่เกิดขึ้นนั้นได้อาหารสะสมเพียงครึ่งของเหง้าปกติและมีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย

การแยกชิ้นส่วนขนาดจิ๋ว

การเพิ่มปริมาณพืชพันธุ์ใหม่ เพื่อให้ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วนั้น จำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้าช่วยสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยชิ้นส่วนขนาดจิ๋วของไม้ดอก สกุลนี้สามารถกระทำได้โดยนำช่อดอกอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยเติม AB เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีนี้จะทำให้ได้ต้นเพิ่มเป็น 3 เท่า ทุก ๆ สัปดาห์ซึ่งจะทำให้ 1 ต้นเพิ่มเป็น 6,500 ต้นใน 1 ปีหรือ 500,000 ต้นใน 18 เดือน ต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์วิธีนี้ จะมีขนาดใกล้เคียงกับต้นกล้าได้จากการเพาะเมล็ดจึงต้องใช้เวลาอีกระยะหนึ่งราว 2 ปี ที่จะผลิตดอกหรือหัวขายได้ (โอพาร และคณะ, 2541)

สารคัดเลือก

ในขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมนั้น ยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ จะถูกถ่ายเข้าพืชพร้อมกันกับยีนอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า **"ยีนเครื่องหมายคัดเลือก"** เพื่อประสิทธิภาพในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้น เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชแต่ละเซลล์ ที่อยู่ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนหรือได้รับการดัดแปรพันธุกรรมนั้น จะเริ่มต้นกันตั้งแต่ในระดับเซลล์ เซลล์ใดที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างครบถ้วน จะถูกคัดเลือกไว้และได้รับการเลี้ยงดูอย่างเหมาะสมจนเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งการคัดเลือกเซลล์พืชดังกล่าวนี้จะอาศัยลักษณะที่แสดงออกโดยการควบคุมของยีนเครื่องหมายคัดเลือกเป็นตัวบ่งชี้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ ได้ถูกนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ kanamycin ซึ่งได้ถูกนำไปใช้ในการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมหลายชนิด เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน จะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารปฏิชีวนะ ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปนั้นไม่สามารถอยู่รอดได้ หน้าที่และความสำคัญของสารคัดเลือกนั้น อยู่ที่การช่วยการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนในระยะแรก เพื่อให้เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นขึ้นมาได้ภายใต้สภาวะที่ต่างไปจากสภาวะปกติในขณะที่เซลล์พืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป ไม่สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะเช่นนั้น เมื่อทำการคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนออกมาแล้ว พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะปกติ จนถึงขั้นให้ผลผลิต(บุญญานารถ, 2545)

ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ kanamycin สกัดแยกมาจาก แบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งยีนดังกล่าวคือ ยีน *NPT II* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ aminoglycoside-3-phosphotransferase ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถทำลายความเป็นพิษ(detoxify) ของยาปฏิชีวนะ kanamycin (พิชญะ, 2547)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim and Kim (2000) การถ่ายยีนในผักกาด *Lactuca sativa* ใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะโดยถ่ายยีน *AmA1* เพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบด่าง โดยใช้ส่วนของยอดเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, benzyladenine (BA) 0.5มิลลิกรัมต่อลิตร, kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตรรากขึ้นได้ดีในอาหาร MS ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำพืชที่ถ่ายยีนแล้วไปตรวจสอบยีน *AmA1*ด้วยวิธีPCR เพื่อยืนยันในระดับ DNA

Xiaomei and Paula (2006) ศึกษาการถ่ายยีนในแบล็คเชอร์รี่ (*Prunus serotina* Ehrh.) ใช้เชื้อเชื้อ *A. tumefaciens* เป็นพาหะโดยถ่ายยีน *AGAMOUS* เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยใช้ส่วนใบของแบล็คเชอร์รี่คัดเลือกเซลล์และยอดโดยใช้เวลา 12 สัปดาห์ โดยเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่เติม kanamycin เป็นสารคัดเลือก ยอดใหม่สามารถเจริญได้ในอาหาร WPM ที่เติม TDZ 9.1 μM , NAA 1.1 μM และ kanamycin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารWPMที่เติม Timentin 300 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อฆ่าเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งการถ่ายยีน *AGAMOUS* สามารถทำได้สำเร็จ ตรวจสอบยีน โดยใช้วิธีPCR

ศรัณยู และคณะ(2547) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญกลับไปเป็นต้นใหม่ของชิ้นใบสตอเบอรี่พันธุ์ Tioga พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือ อาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ การศึกษาผลของยาปฏิชีวนะพบว่า kanamycin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญกลับเป็นต้นใหม่ของชิ้นใบสตอเบอรี่พันธุ์นี้ได้มากกว่า 90% สร้างยีนดัดแปลงของแอนติฟริซโปรตีน isoform HPLC 6 โดยมีโคดอนเหมาะสม แสดงออกในพืชสตอเบอรี่ได้สำเร็จ แล้วถ่ายยีนแอนติฟริซโปรตีนทั้งจากธรรมชาติในพลาสมิด pSW1 และยีนแอนติฟริซโปรตีนที่มีโคดอนเหมาะสม แสดงออกในสตอเบอรี่ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pBB เข้าสู่ชิ้นใบของสตอเบอรี่ โดยอาศัยเชื้อ *A. tumefaciens* LBA 4404 ซึ่งพบว่าสตอเบอรี่ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถออกรากในอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่สามารถออกรากในอาหารดังกล่าวได้ ผลจากการทำ PCR พบยีนแอนติฟริซแทรกในจีโนมของต้นสตอเบอรี่ที่ได้รับการถ่ายยีน

Supuk และคณะ(2005) ศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิงค์ใช้ส่วนของ retarded shoots โดยอาศัยเชื้อ *A. tumefaciens* AGLO ที่มีเวคเตอร์ pBI121 or pBI121-*Ca-ACS1* เลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหาร MS ที่ประกอบไปด้วย IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร , IMA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร , TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร , kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ vancomycin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 อาทิตย์ เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์พบว่าเกิดตายอดเล็ก ๆ ขึ้นบนอาหาร MS ที่เติม kanamycin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเป็น MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร , kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 อาทิตย์ ใช้วิธี PCR ทดสอบ และพบว่ามีชิ้นส่วนมากกว่า 14 % ที่สามารถถ่ายยีนได้สำเร็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันเพ็ญ และคณะ(2546) การพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน โดยการคัดเลือก embryogenic callus ของแตงกวาพันธุ์เจ็ดใบ คัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมอยู่ callus ที่ไม่ได้รับ*ยีน NPT II* ในพลาสมิด p23W1 จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด มีการยุบตัวเป็นก้อนเหนียว ๆ และตายเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ 21 %

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนเริ่มต้น
   1.1 หน่อปทุมมาที่ได้จากต้นปทุมมาที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ
2. สารเคมี
   2.1 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)
   2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA
3. สารปฏิชีวนะ
   3.1 kanamycin
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์
   4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารkanamycin ได้แก่ ไมโครปิเปต ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์
   4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวงแท่งแก้วคนสาร เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟรอยด์ ถุงพลาสติก ยางรัด
   4.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ไมโครปิเปต ตะเกียงแอลกอฮอล์ สารละลาย kanamycin ขวดแก้วขนาดเล็กพร้อมฝาปิดที่นึ่งฆ่าเชื้อ
   4.4 อุปกรณ์สำหรับตัดชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้สำหรับตัดชิ้นส่วนพืช ตะเกียงแอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว บีกเกอร์
   4.5 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่25$\pm$3 องศาเซลเซียสให้แสงจากหลอดไฟ Cool White วันละ 16 ชั่วโมง
   4.6 อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

วิธีการ

1. การเตรียมสาร kanamycin

- ใส่น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลตร ลงในขวดของสาร kanamycin ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- เขย่าให้สาร kanamycin ละลาย
- ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย kanamycin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเอพริลดรอป
- นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมอาหาร

การเตรียม Stock solution ของอาหารพื้นฐานสูตร Murashige and Skoog (1962) (ตาราง ภาคผนวกที่ 1)

การเตรียมอาหารที่ใช้ในการทดลองปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำได้โดย

- ใส่น้ำกลั่นประมาณ 300 ml ในกระบอกตวงปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- เติม Stock solution ของอาหารพื้นฐานสูตร Murashige and Skoog (1962)
- เติมน้ำตาล 30 กรัม ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย
- เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ปรับปริมาตรให้เป็น 800 มิลลิลิตร
- นำไปวัด pH ให้ได้ 5.5-5.7 โดยใช้ NaOH 1 N และ HCl 1 N
- ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ใส่วุ้น 8 กรัม เคี่ยวจนวุ้นละลาย
- แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยฟรอยด์ ถุงพลาสติก และใช้ยางรัดให้แน่น
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงชิ้นส่วน

- นำอาหารเข้าตู้ตัดชิ้นส่วนทีละขวด โดยทิ้งไว้ให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส
- ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย kanamycin ที่ได้เตรียมไว้ตามปริมาณที่คำนวณได้ในแต่ละความเข้มข้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เขย่าให้เข้ากัน
- เทอาหารลงในขวดแก้วขนาดเล็กโดยแบ่งใส่ขวดละ 15 มิลลิลิตร
- ขวดอาหารที่ยังไม่ได้นำเข้าตู้ตัดชิ้นส่วน นำไปใส่ไว้ใน water bath ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส

4.วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหน่อปทุมมา

1.1 นำต้นปทุมมาที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาตัดส่วนใบ ลำต้น และรากทิ้ง เหลือเพียงส่วนหน่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ลอกกาบออกประมาณ 3-5 ชั้น ตัดให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร โดยให้แต่ละชิ้นมีจุดเจริญอยู่ด้วย

2. นำชิ้นส่วนที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 0 25 50 75 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 8 treatments แต่ละ treatments มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้น

จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±3 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอด Cool White เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารทุก 2 อาทิตย์

การบันทึกข้อมูลผลการทดลอง

ทำการบันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ดังนี้

1. บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนโดยการให้คะแนน ซึ่งมีหลักเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

   คะแนน 1 : ต้นตาย

   คะแนน 2 : ต้นสีเหลือง หรือ สีน้ำตาล

   คะแนน 3 : ต้นสีเขียวไม่มีจำนวนใบ หรือ รากเกิดขึ้น

   คะแนน 4 : ต้นสีเขียวมีจำนวนใบ หรือ รากเพิ่มขึ้น

   คะแนน 5 : ต้นสีเขียวมีจำนวนใบ หรือ รากเพิ่มขึ้น มีการแตกหน่อเกิดขึ้น

2. จำนวนการแตกหน่อที่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์

3. จำนวนการเกิดรากในแต่ละสัปดาห์

สถานที่ทำการทดลอง

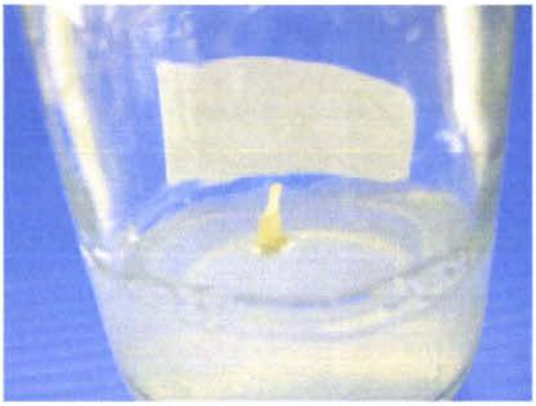
ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลอง	16 สิงหาคม 2549
สิ้นสุดการทดลอง	11 ตุลาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A



B

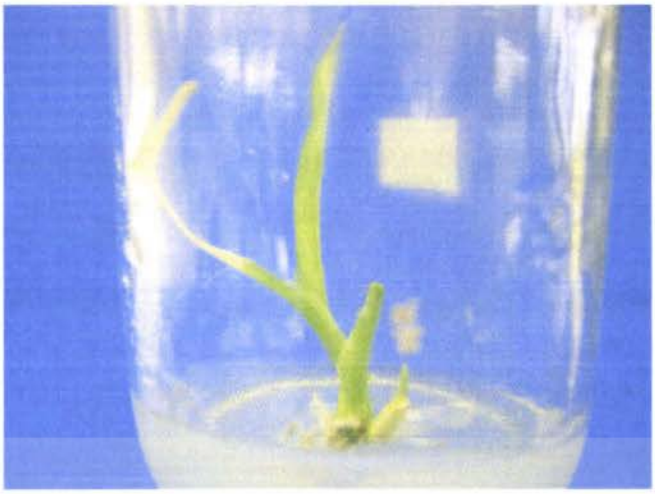
C

D

E

ภาพที่ 1 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin A = คะแนน 1 B = คะแนน 2 C = คะแนน 3 D = คะแนน 4 E = คะแนน 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะหน่อที่เกิดขึ้นใหม่ที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ภาพที่ 3 แสดงการเกิดรากที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

ในสัปดาห์ที่ 1ชิ้นส่วนหน่อของปทุมมา ที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนมีลักษณะของหน่อที่คล้ายกัน คือ หน่อมีสีเขียว ไม่มีจำนวนใบ หรือรากเกิดขึ้น (ตารางที่ 1) โดยมีคะแนนการเจริญเติบโตคือ 3.0000 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ที่ความเข้มข้น 75 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะของหน่อจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง โดยไม่มีจำนวนใบหรือรากเกิดขึ้นเช่นเดียวกับ ไม่มีการเพิ่มจำนวนหน่อ (ตารางที่ 2) และไม่มีการเพิ่มจำนวนราก (ตารางที่ 3)

สัปดาห์ที่ 2 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนหน่อของปทุมมา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin โดยความเข้มข้นที่ 0 -75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มของจำนวนหน่อ คือ 0.3333 และ 0.2000 หน่อ (ตารางที่ 2) มีการเกิดราก คือ 0.53333 0.4000 และ 0.2667 ราก ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ในลักษณะที่คล้ายกันโดยหน่อมีสีเขียว มีใบเกิดขึ้น ส่วนความเข้มข้นที่ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีบางหน่อที่มีสีเหลืองและไม่มีจำนวนใบ ราก หน่อเกิดขึ้น หน่อส่วนใหญ่ยังคงมีสีเขียวและมีการเกิดใบหรือรากขึ้น อาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรมีคะแนนการเจริญเติบโต คือ 2.5333 หน่อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง โดยไม่มีจำนวนหน่อเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) หรือจำนวนรากเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3) โดยอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0และ 25 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.33 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 2.4

สัปดาห์ที่ 3 ชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อยังคงเป็นสีเขียวมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบ จำนวนหน่อ คือ 0.9167 0.7333 และ 0.5333 หน่อ (ตารางที่ 2) การเพิ่มขึ้นของจำนวนราก คือ 1.4167 1.6000 และ 1.3333 ราก (ตารางที่ 3) ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร จะแตกต่างจากความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากมีบางชิ้นส่วนของหน่อที่ยังคงเป็นสีเขียว มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ คือ 0.4667 หน่อ (ตารางที่ 2) จำนวนราก คือ 0.8667 ราก (ตารางที่ 3) และบางชิ้นส่วนที่เป็นสีเหลือง ไม่มีการเจริญเติบโตใดๆ อาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนการเจริญเติบโต คือ 2.4667 หน่อยังคงเปลี่ยนเป็นสีเหลืองโดยไม่มีการเพิ่มของจำนวนหน่อ (ตารางที่ 2) และราก (ตารางที่ 3) อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.5 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 2.2267

สัปดาห์ที่ 4 อาหารเลี้ยงชิ้นส่วนที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อของปทุมมายังคงมีสีเขียว และมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ คือ 1.5833 1.1333 หน่อ (ตารางที่ 2) และจำนวนราก คือ 2.8333 2.4667 และ 2.200 ราก (ตารางที่ 3) โดยอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดรากเท่ากับอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตคล้ายสัปดาห์ที่ 3 แต่มีการเพิ่มขึ้นของหน่อ คือ 0.7333 หน่อ (ตารางที่ 2) และราก คือ 1.4667 ราก (ตารางที่ 3) ในชิ้นส่วนที่เป็นสีเขียว ความเข้มข้นของอาหารที่เติม kanamycin ที่ 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยหน่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมดมีคะแนนการเจริญเติบโต คือ 2.2667 ไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ (ตารางที่ 2) และจำนวนราก (ตารางที่ 3) อาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.75 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 150 และ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 2.1333

สัปดาห์ที่ 5 อาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) มีการเพิ่มขึ้นของหน่อ คือ 2.1667 1.6667 1.5333 หน่อ (ตารางที่ 2) และราก คือ 3.4167 2.8000 2.4667 ราก (ตารางที่ 3) ในลักษณะที่คล้ายกัน อาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มขึ้นของหน่อ คือ 0.9333 หน่อ (ตารางที่ 2) และรากเพิ่มขึ้น คือ 1.6667 ราก (ตารางที่ 3) ส่วนอาหารเลี้ยงชิ้นส่วนที่เติม kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยหน่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไม่มีการเจริญเติบโตคล้ายสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 1) โดยอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.5833 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 150 และ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 2.1333

สัปดาห์ที่ 6 หน่อที่เลี้ยงบนอาหาร MSที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อของปทุมมายังคงมีสีเขียวมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ คือ 2.7500 1.9333 หน่อ (ตารางที่ 2) และจำนวนราก คือ 4.3333 3.2000 2.7333 ราก (ตารางที่ 3) อาหารที่เติม kanamycin ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ (ตารางที่ 2) และจำนวนราก (ตารางที่ 3) ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 1) โดยอาหารที่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.5833 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 2.1333

สัปดาห์ที่ 7 ชิ้นส่วนของหน่อปทุมมาที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มขึ้นของหน่อ คือ 3.3333 2.4667 2.6000 หน่อ (ตารางที่ 2) และราก คือ 5.4167 3.6000 3.4667 ราก (ตารางที่ 3) ความเข้มข้นของ kanamycin ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ(ตารางที่ 2) แต่มีจำนวนรากเพิ่มขึ้น คือ 1.9333 ราก (ตารางที่ 3) ส่วนหน่อที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร หน่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีการเจริญเติบโต (ตารางที่ 1) แต่หน่อที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรมีบางชิ้นส่วนที่เริ่มตายโดยมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มเกือบดำโดยอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.5833 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 1.800

สัปดาห์ที่ 8 ชิ้นส่วนหน่อของปทุมมา ที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้นที่ 0 25 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อคือ 3.8333 2.7333 2.8000 หน่อ (ตารางที่ 2) และราก คือ 6.6667 4.6667 4.4667 ราก (ตารางที่ 3) ตามลำดับ อาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตคล้ายสัปดาห์ที่ 7 แต่มีจำนวนรากเพิ่มขึ้น คือ 2.1333 ราก (ตารางที่ 3) ส่วนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นที่ 100 125 150 มิลลิกรัม มีการเจริญเติบโตคล้ายสัปดาห์ที่ 7 โดยไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนหน่อ (ตารางที่ 2) หรือราก (ตารางที่ 3) ส่วนอาหารเลี้ยงชิ้นส่วนที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการตายของชิ้นส่วนเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 1) แต่ชิ้นส่วนส่วนใหญ่ยังคงเป็นสีน้ำตาล โดยอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 0 มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด คือ 4.7500 ส่วนอาหารที่เติม kanamycin ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 มีคะแนนการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด คือ 1.6000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ Kanamycin(mg/L)	สัปดาห์ที่ 1 (±SE)	สัปดาห์ที่ 2 (±SE)	สัปดาห์ที่ 3 (±SE)	สัปดาห์ที่ 4 (±SE)	สัปดาห์ที่ 5 (±SE)	สัปดาห์ที่ 6 (±SE)	สัปดาห์ที่ 7 (±SE)	สัปดาห์ที่ 8 (±SE)
0	3.0000±0.00a	4.3333±0.04a	4.5000±0.00b	4.7500±0.00b	4.58333±0.07b	4.5833±0.07b	4.5833±0.07b	4.7500±0.12b
25	3.0000±0.00a	4.3333±0.04a	4.4000±0.00a	4.5333±0.07a	4.4667±0.07a	4.4000±0.00a	4.5333±0.07a	4.2667±0.07a
50	3.0000±0.00a	4.2000±0.00a	4.2667±0.07a	4.6000±0.00a	4.4000±0.00a	4.4000±0.00a	4.5333±0.07a	4.2667±0.07a
75	2.8000±0.07b	3.5333±0.13b	3.6000±0.12c	3.6000±0.20c	3.5333±0.13c	3.3333±0.13c	3.3333±0.13c	3.3333±0.13c
100	2.6667±0.07c	2.5333±0.07c	2.4667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d
125	2.6000±0.00cd	2.6000±0.00c	2.4000±0.00d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d	2.2667±0.07d
150	2.4667±0.07e	2.5333±0.07c	2.4667±0.07d	2.1333±0.07d	2.1333±0.07d	2.1333±0.07d	2.1333±0.07d	2.1333±0.07d
200	2.5333±0.07de	2.4000±0.00c	2.2667±0.07d	2.1333±0.07d	2.1333±0.07d	2.1333±0.07d	1.8000±0.00e	1.6000±0.00e
F-test	*	*	*	*	*	*	*	*
CV%	2.5635 %	3.4903 %	3.3666 %	4.7860 %	4.1202 %	3.9508 %	4.1757 %	4.7272 %

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนหน่อของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ Kanamycin(mg/L)	สัปดาห์ที่ 1 (±SE)	สัปดาห์ที่ 2 (±SE)	สัปดาห์ที่ 3 (±SE)	สัปดาห์ที่ 4 (±SE)	สัปดาห์ที่ 5 (±SE)	สัปดาห์ที่ 6 (±SE)	สัปดาห์ที่ 7 (±SE)	สัปดาห์ที่ 8 (±SE)
0	1.0000±0.00	1.3333±0.07a	1.6667±0.07ab	2.2667±0.07a	2.7333±0.07a	3.2000±0.12a	3.6667±0.07a	4.0667±0.07a
25	1.0000±0.00	1.3333±0.07a	1.7333±0.07a	2.2000±0.12a	2.6667±0.13ab	2.9333±0.13b	3.4667±0.07a	3.7333±0.13b
50	1.0000±0.00	1.2000±0.00b	1.5333±0.07bc	2.1333±0.07a	2.5333±0.07b	2.9333±0.07b	3.4667±0.07a	3.8000±0.12b
75	1.0000±0.00	1.2000±0.00b	1.4667±0.07c	1.7333±0.07b	1.9333±0.07c	1.9333±0.07c	1.9333±0.07b	1.9333±0.07c
100	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d
125	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d
150	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d
200	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d
F-test	ns	*	*	*	*	*	*	*
CV%	0.0000%	5.0943 %	6.2807 %	6.4865 %	6.2315 %	6.5320 %	6.2467 %	5.5882 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

98532

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

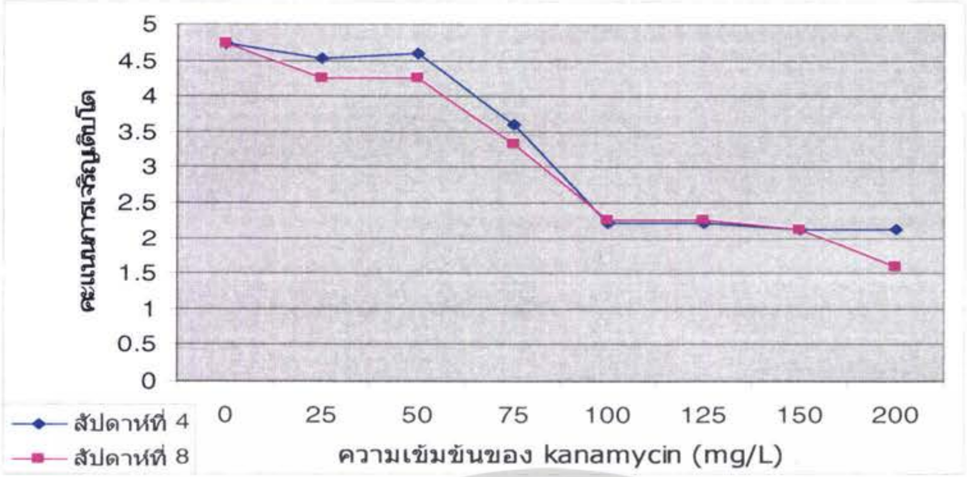
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนรากของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ Kanamycin(mg/L)	สัปดาห์ที่ 1 (±SE)	สัปดาห์ที่ 2 (±SE)	สัปดาห์ที่ 3 (±SE)	สัปดาห์ที่ 4 (±SE)	สัปดาห์ที่ 5 (±SE)	สัปดาห์ที่ 6 (±SE)	สัปดาห์ที่ 7 (±SE)	สัปดาห์ที่ 8 (±SE)
0	1.0000±0.00	1.4667±0.13a	2.3333±0.13b	3.2667±0.07ab	3.7333±0.07ab	4.4667±0.07a	5.3333±0.13a	6.2667±0.07a
25	1.0000±0.00	1.4000±0.00ab	2.6000±0.12a	3.4667±0.07a	3.8000±0.12a	4.2000±0.12b	4.6000±0.20b	5.6667±0.07b
50	1.0000±0.00	1.2667±0.07b	2.3333±0.07b	3.2000±0.12b	3.4667±0.13b	3.7333±0.07c	4.4667±0.07b	5.4667±0.07c
75	1.0000±0.00	1.2667±0.07b	1.8667±0.07c	2.4667±0.18c	2.6667±0.18c	2.6667±0.18d	2.9333±0.13c	3.1333±0.13d
100	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e
125	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e
150	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e
200	1.0000±0.00	1.0000±0.00c	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e	1.0000±0.00d	1.0000±0.00e
F-test	ns	*	*	*	*	*	*	*
CV%	0.0000%	8.5106 %	7.4604 %	6.8986 %	7.1599 %	5.9338 %	6.4952 %	3.5221 %

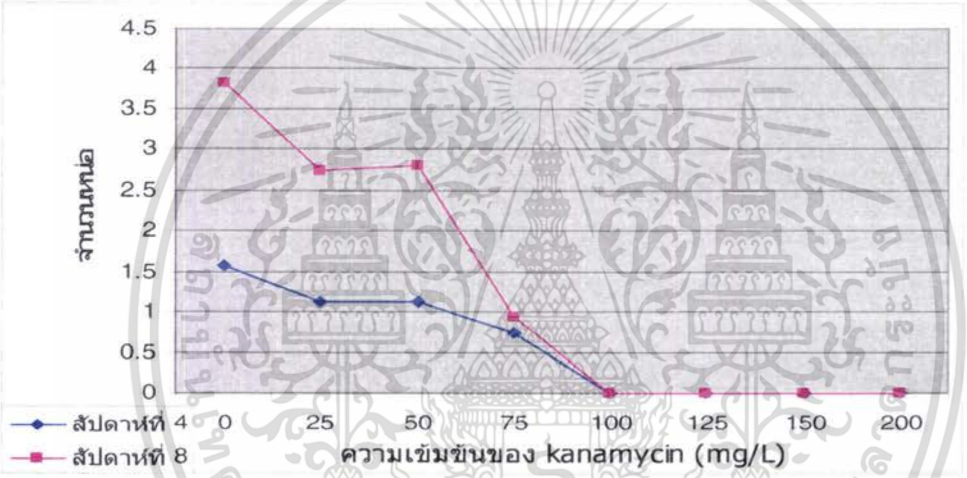
^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

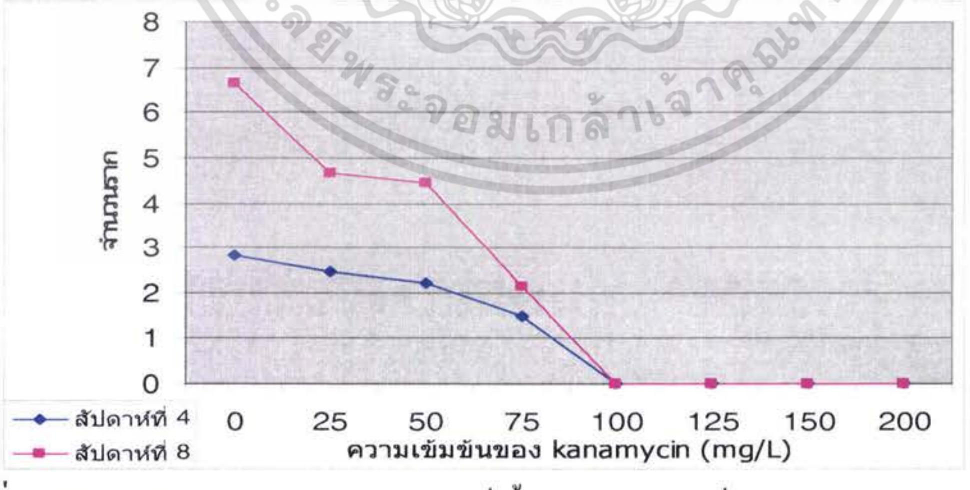
A



B



C



ภาพที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของหน่อปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเวลา 8 สัปดาห์

A การเจริญเติบโตของหน่อ B จำนวนหน่อ C จำนวนราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา โดยนำชิ้นส่วนของหน่อไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 25 50 75 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์และเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่าอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ 4.75 คะแนน มีจำนวนการเกิดหน่อและจำนวนรากมากที่สุด คือ 3.8333 และ 6.6667 ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนปทุมมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด ไม่มีการเพิ่มขึ้นของหน่อ และ ไม่มีการเพิ่มขึ้นของราก อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ชิ้นส่วนปทุมมาตายโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ 60 % ซึ่งสาเหตุ ที่ทำให้ชิ้นส่วนหน่อของปทุมมาตายไม่ถึง 100% อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่เกินไป ทำให้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใส่ลงไปได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร เช่นเดียวกับงานของ วันเพ็ญ (2546) ในขั้นตอนของการคัดเลือก embryogenic callus ของแตงกวาพันธุ์เจ็ดใบ คัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมอยู่ callus ที่ไม่ได้รับ*ยีน NPT II* ในพลาสมิด p23W1 จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด ยุบตัวเป็นก้อนเหนียว ๆ และตายเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ 21 % สูตรอาหารคัดเลือกที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และชิ้นส่วนที่ใช้ เช่น การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบพันธุ์ Carl Red สามารถคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (รองรอง, 2541) ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พิงค์ใช้ส่วนของ retarded shoots สามารถคัดเลือกชิ้นส่วนที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Supuk และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา โดยนำชิ้นส่วนของหน่อปทุมมาไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 25 50 75 100 125 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ พบว่า อาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ 4.75 คะแนน มีจำนวนการเกิดหน่อมากที่สุด คือ 3.8333 หน่อ และจำนวนรากมากที่สุด คือ 6.6667 ราก เนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงชิ้นส่วนของปทุมมา ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนปทุมมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด ไม่มีการเพิ่มขึ้นของหน่อ และ ไม่มีการเพิ่มขึ้นของราก และอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้น ที่ทำให้ชิ้นส่วนปทุมมาตาย โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ 60 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บุญญานาถ นาถวงษ์. 2545. ข่าวสารศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 73140

ทวีพงศ์ เลิศมณี. 2548. มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒประสานมิตร. มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรประสานมิตร. http://www.swu.ac.th/bot/documents%5C%E0%B8%9B%A1%E0%B8%A1%E0%B8%B2%20Siam%20Tulip.doc

พิชญะ แสงสูรย์. 2547. ความสุ่มเสี่ยงรู้ทันจีเอ็มโอ. หนังสือพิมพ์มติชน. http://www.carefor.org/content/view/592/152/

รองรอง หอมหวน. 2541. เทคนิคการถ่ายยีนในกุหลาบ. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ. 2546. การพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. http://www.doa.go.th/web-itc/library/libarary/plant_protect46/1229.pdf

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว *(Curcuma)* ไม้ดอกไม้ประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ

ศรัณยู คำเมือง และคณะ. 2547. *Agrobacterium*-mediated transformation of modified antifreeze protein gene in strawberry. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 27(4) : 693-703

โอพาร พิทักษ์ และคณะ. 2541. ไม้ตัดดอกเขตร้อนการปลูกปทุมมาและกระเจียว. เอกสารคำแนะนำ กรมส่งเสริมการเกษตร. http://web.ku.ac.th/agri/patumma/index.html

Kim Taegeum and Kim Youngsook 2000. Heterologous expression of *AmA1* gene encoding storage protein of amaranthus in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, 41 (5) : 495-498.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xiaomei Liu and Paula M. Pijut. 2006. Adventitious shoot regeneration and genetic transformation of *Prunus serotina* (black cherry) for reproductive sterility. Purdue University, Dept. of Forestry and Natural Resources, Hardwood Tree Improvement and Regeneration Center (HTIRC),715 West State St., West Lafayette, IN 47907, USDA Forest Service, Northern Research Station, HTIRC, 715 West State St., West Lafayette, IN 47907.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

<u>ตารางภาคผนวกที่ 1</u> ปริมาณสารเคมีในสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
$CaCl_2.H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.4H_2O$	8.60
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Glycine	2.00
Myo-inositol	100.00
Thiamine HCl	0.40
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Na_2EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Sucrose	30,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางภาคผนวกที่ 2</u> การวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
treatment	7	25.6650	3.6664	157.13	2.66	4.03	0.0000
Ex.Error	16	0.3733	0.0233				
Total	23	26.0383	1.1321				

GRAND MEAN = 3.19166668256124 CV = 4.7860 %

LSD .05 = .264410428314731

LSD .01 = .364312670333645

<u>ตารางภาคผนวกที่ 3</u> การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนหน่อของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
treatment	7	7.5583	1.0798	107.98	2.66	4.03	0.0000
Ex.Error	16	0.1600	0.0100				
Total	23	7.7183	0.3356				

GRAND MEAN = 1.54166668156783 CV = 6.4865 %

LSD .05 = .173097299230619

LSD .01 = .238498684458792

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนรากของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 4

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
treatment	7	28.1800	4.0257	201.29	2.66	4.03	0.0000
Ex.Error	16	0.3200	0.0200				
Total	23	28.5000	1.2391				

GRAND MEAN = 2.05000002185504 CV = 6.8986 %

LSD .05 = .244796487386228

LSD .01 = .337287990403383

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
treatment	7	23.2383	3.3198	165.99	2.66	4.03	0.0000
Ex.Error	16	0.3200	0.0200				
Total	23	23.5583	1.0243				

GRAND MEAN = 2.99166665971279 CV = 4.7272 %

LSD .05 = .244796572500471

LSD .01 = .337288107676357

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนหน่อชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
treatment	7	42.6783	6.0969	406.46	2.66	4.03	0.0000
Ex.Error	16	0.2400	0.0150				
Total	23	42.9183	1.8660				

GRAND MEAN = 2.19166664282481 CV = 5.5882 %

LSD .05 = .212000022464347

LSD .01 = .292100030952056

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนรากชิ้นส่วนปทุมมาที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
treatment	7	119.5467	17.0781	1463.84	2.66	4.03	0.0000
Ex.Error	16	0.1867	0.0117				
Total	23	119.7333	5.2058				

GRAND MEAN = 3.06666666269302 CV = 3.5221 %

LSD .05 = .186966502398414

LSD .01 = .257608091276306

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้