

การศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมาด้วยอะโกรแบคทีเรีย

สุดชวัลย์ บุญญะวัตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2550

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ชื่อเรื่อง

การศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมาด้วยอะโกรแบคทีเรีย

โดย

สุภาวดี บุญญะวัตร

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี)

วันที่ 19 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2550

กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์เรวดี วุฒิจำนงค์)

วันที่ 19 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2550

กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.ช่อทิพา สฤตสิงหาโรจน์)

วันที่ 19 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2550

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ โนรี)

วันที่ 23 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2550

โครงการบัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เทพ พงษ์พานิช)

ประธานคณะกรรมการโครงการบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 23 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2550

ชื่อเรื่อง	การศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมาด้วยอะโกรแบคทีเรีย
ชื่อผู้เขียน	นางสาวสุภาวีย์ บุญญะวัตร
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

บทคัดย่อ

การศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) ด้วยอะโกรแบคทีเรีย โดยทำการศึกษาความสามารถในการเกิดยอดใหม่ของช่อดอกอ่อนและกาบใบของปทุมมาจากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดพบว่า ชี้นส่วนกาบใบสามารถเกิดยอดใหม่ได้สูงสุดคือ 83.33 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดใหม่ 9.90 ยอดต่อชี้นส่วนกาบใบ และเมื่อศึกษาจุดกำเนิดของยอดใหม่พบว่ามีจุดกำเนิดใกล้บริเวณรอยต่อระหว่างกาบใบและฐานของตาและใช้เวลา 15 วันตั้งแต่เริ่มนำตามาเพาะเลี้ยงจนเริ่มเห็นจุดเจริญของยอด สำหรับช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดใหม่ 5.33 ยอดต่อชี้นส่วนของช่อดอกอ่อน และพบจุดกำเนิดยอดใหม่จากชี้นส่วนช่อดอกอ่อนหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน จากการศึกษาความสามารถในการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGLO ซึ่งประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 2201 pCAMBIA 1305.1 และ pCAMBIA 1305.2 และทดสอบความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยตรวจดูการเกิดจุดสีน้ำเงินเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย X – Gluc พบว่า อะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 มีความสามารถในการถ่ายยีนได้ดีโดยสามารถถ่ายยีนเข้าสู่ชี้นส่วนของกาบใบเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนจุดสีน้ำเงิน 8.00 จุดต่อชี้นส่วนกาบใบ และชี้นส่วนช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการถ่ายยีนเท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนจุดสีน้ำเงิน 13.33 จุดต่อชี้นส่วนช่อดอกอ่อน อะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วย พลาสมิด pCAMBIA 2201 สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ชี้นส่วนช่อดอกอ่อนเท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนจุดสีน้ำเงิน 5.00 จุดต่อชี้นส่วนช่อดอกอ่อน

Title	A study on genetic transformation of <i>Curcuma alismatifolia</i> Gagnep. by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Author	Miss Sudawan Boonyawat
Degree of	Master of Science in Horticulture
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Chalerm Sri Nontaswatsri

ABSTRACT

A study on genetic transformation of *Curcuma* (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) by *Agrobacterium* was conducted to investigate shoot regeneration ability of leaf sheath and young inflorescence. The results of the study on regeneration ability showed that leaf sheath explants were able to produce higher regeneration ability (83.33%) and higher number of shoots per explant (9.9) than young inflorescence. The investigation on new shoot primordia showed that most of them were located in the connecting area between leaf sheath and basal plate. Shoot primordia appeared and were observed in explants 15 days in leaf sheath. For young inflorescence, regeneration percentage was 70% and had 5.33 shoots per explant and shoot primordias were found in explants 20 days after culture. Results of study on genetic transformation of *Curcuma* using *Agrobacterium* strain AGLO containing pCAMBIA 2201, pCAMBIA 1305.1 and pCAMBIA 1305.2 plasmids and successful trial on genetic transformation as estimated by GUS spots on the explants after overnight incubation in X - Gluc solution, showed that *Agrobacterium* with pCAMBIA 1305.2 plasmid gave a high genetic transformation ability in leaf sheath explants (33.33% GUS positive explants and 8.0 GUS spots per explant) while in young inflorescence explants, genetic transformation ability was indicated by 40.00% GUS positive explants and 13.33 GUS spots per explant. Further results indicated that *Agrobacterium* with pCAMBIA 2201 plasmid was able to transfer genes into young inflorescence explants at low transformation rate of 16.67% GUS positive explants and 5.0 GUS spots per explant.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ที่จัดทำขึ้นในครั้งนี้นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการวางแผนดำเนินงานทดลอง ตลอดจนช่วยสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์สำหรับการดำเนินงาน และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบพระคุณอาจารย์เรวดี ภูมิจันทร์ อาจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุดสิงหาโรจน์ กรรมการที่ปรึกษาและอาจารย์ ดร.วิวัฒน์ บัณฑิตย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อบุญสิน บุญญะวัตร คุณแม่เชื้อม บุญญะวัตร ผู้ให้กำเนิดให้โอกาสทางการศึกษา สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาเล่าเรียนมาโดยตลอด และขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องทุกคนที่เป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ศุภาวัลย์ บุญญะวัตร

กรกฎาคม 2550

สารบัญ

หน้า

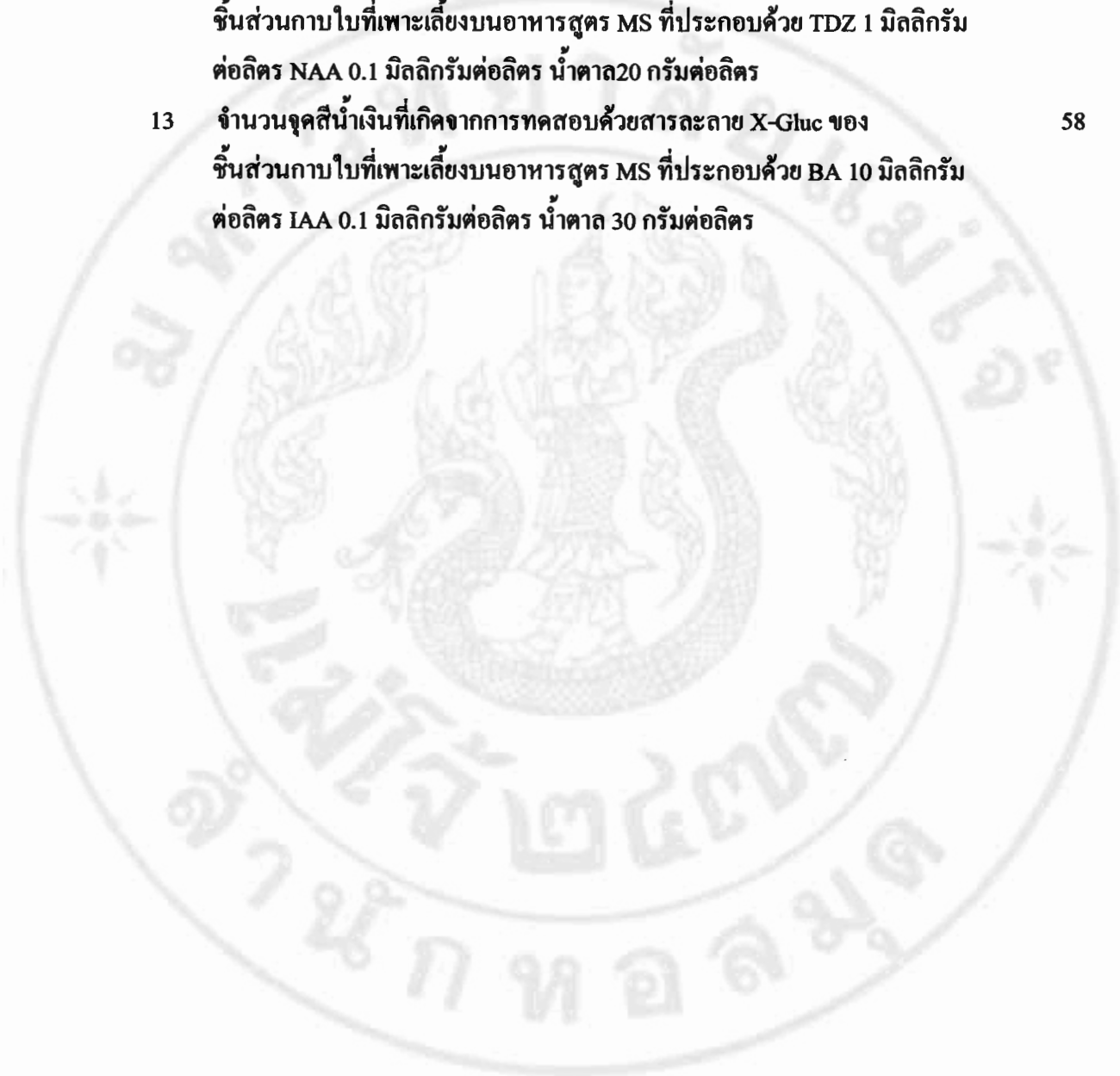
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
สารบัญภาคผนวก	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	15
อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมา	15
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน	17
วิธีการทดลอง	21
การทดลองที่ 1 การศึกษาการเกิดยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน	21
กาบใบและช่อดอกอ่อน	
การทดลองที่ 2 การศึกษาหาจุดกำเนิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนกาบใบ	22
และช่อดอกอ่อน	
การทดลองที่ 3 การศึกษาการตายเนื่องจากสารปฏิชีวนะ Kanamycin	23
ของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน	
การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อ และการเพาะเลี้ยง	24
อะโกรแบคทีเรียร่วมกับชิ้นส่วนพืช	

บทที่ 4 ผลการทดลอง	31
การทดลองที่ 1 การศึกษาการเกิดยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน	31
การทดลองที่ 2 การศึกษาหาจุดกำเนิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน	45
การทดลองที่ 3 การศึกษาการตายเนื่องจากสารปฏิชีวนะ Kanamycin ของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน	47
การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อ และการเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับชิ้นส่วนพืช	50
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง	60
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	63
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์, ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ และตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปรียบเทียบจำนวนการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์	69
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc และจำนวนจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน	91
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย	98

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)	16
2 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 - 18 สัปดาห์	37
3 จำนวนต้นใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 - 18 สัปดาห์	38
4 เปรียบเทียบจำนวนการเกิดต้นใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา แต่ละสายพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์	39
5 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 6 -20 สัปดาห์	40
6 จำนวนต้นใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 6 - 20 สัปดาห์	41
7 เปรียบเทียบจำนวนการเกิดต้นใหม่จากชิ้นช่อดอกอ่อนของปทุมมา แต่ละสายพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์	42
8 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของ ชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร	53
9 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของ ชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร	54
10 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของ ชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร	55

ตาราง(ต่อ)	หน้า
11 จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของ ชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัม ต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร	56
12 จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของ ชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร	57
13 จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของ ชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัม ต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร	58



สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ชิ้นส่วนคาของปทุมมาขนาด 3.0 เซนติเมตร	15
2	ช่อดอกอ่อนของปทุมมาที่ยังไม่บานขนาดความยาว 9 - 10 เซนติเมตร	15
3	พลาสมิด pCAMBIA 2201	18
4	พลาสมิด pCAMBIA 1305.1	19
5	พลาสมิด pCAMBIA 1305.2	20
6	การเกิดต้นใหม่ต่อชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน	43
7	การเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมา	44
8	การเกิดจุดกำเนิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบที่ได้จากตาและช่อดอกอ่อนของปทุมมา	46
9	ความสัมพันธระหว่างระดับความเข้มข้นของ Kanamycin ต่ออัตราการตายของปทุมมา 3 สายพันธุ์	48
10	การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ Kanamycin ของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในปทุมมา	49
11	ชิ้นส่วนของปทุมมาที่นำมาถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ที่ถ่ายสู่ปทุมมา	59

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก	หน้า
1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์	70
2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์	70
3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์	71
4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์	71
5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์	72
6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์	72
7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์	73
8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์	73

ตารางผนวก(ต่อ)	หน้า
9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์	74
10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์	74
11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์	75
12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์	75
13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์	76
14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์	76
15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์	77
16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 20 สัปดาห์	77
17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์	78

ตารางผนวก(ต่อ)	หน้า
18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 6 สัปดาห์	78
19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์	79
20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 10 สัปดาห์	79
21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์	80
22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 14 สัปดาห์	80
23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 16 สัปดาห์	81
24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นเวลา 18 สัปดาห์	81
25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์	82
26 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์	82

ตารางผนวก(ต่อ)	หน้า
27 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์	83
28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์	83
29 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์	84
30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์	84
31 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์	85
32 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวน ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการ ทดลองเป็นเวลา 20 สัปดาห์	85
33 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	86
34 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์ซ่อมรกด หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	86
35 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์เขียวใหม่ไวท์ หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	87

ตารางผนวก(ต่อ)	หน้า
36 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่เรด หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	87
37 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่พังก์ หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	88
38 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์สโนไวท์ หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	88
39 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกต หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	89
40 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์ หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	89
41 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่เรด หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	90
42 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบ การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่พังก์ หลังจากทำการทดลองทุก 2 สัปดาห์	90

ตารางผนวก(ต่อ)	หน้า
43 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$	92
44 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$	93
45 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$	94
46 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุดสีน้ำตาลเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$	95
47 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุดสีน้ำตาลเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$	96
48 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุดสีน้ำตาลเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$	97

บทที่ 1

บทนำ

ปทุมมาเป็นไม้ตัดดอกประเภทหัวชนิดหนึ่งอยู่ในเขตร้อนชื้น เป็นไม้ดอกพื้นเมืองและสมุนไพรป่า พบได้ในบริเวณทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย เนื่องจากปทุมมามีลักษณะดอกและสีต้นที่สวยงามสะดุดตา จึงได้กลายเป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจและมีแนวโน้มทางการตลาดที่ดีสามารถส่งออกได้ในหลายประเทศ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาพันธุ์ปทุมมาเพื่อใช้เป็นไม้ตัดดอก ไม้กระถาง และไม้ประดับแปลง ในปี 2541 มีการส่งออกปทุมมามูลค่าถึง 30-40 ล้านบาท (โอฬาร, 2542) ซึ่งตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (พิศิษฐ์, 2534) โดยส่งจำหน่ายในลักษณะของหัวพันธุ์ แต่หัวพันธุ์ที่ผลิตได้ยังมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด อีกทั้งยังประสบปัญหาโรคเน่าหรือโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* ทำให้ผลผลิตของปทุมมาลดลง และยังทำให้ตลาดไม่รับซื้อหัวพันธุ์เหล่านั้น นอกจากนี้ในการผลิตปทุมมาเพื่อใช้เป็นไม้ตัดดอกยังขาดลักษณะที่สำคัญคือคุณภาพของดอกจะสังเกตได้จากกลีบประดับอ่อนทำให้ยากต่อการขนส่งในระยะทางไกล มีอายุการใช้งานของดอกสั้น รวมทั้งยังขาดความหลากหลายของลักษณะสีต้นดอก และกลีบประดับ และตลาดต่างประเทศมีความพอใจดอกปทุมมาเพียงระดับหนึ่ง (สุรวิษ, 2539) ซึ่งในปัจจุบันได้มีเกษตรกรและนักวิจัยจำนวนมากพยายามปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิมแต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้เวลานานและหากต้องการปรับปรุงลักษณะที่ไม่มีแหล่งพันธุกรรมในปทุมมาก็ไม่สามารถปรับปรุงลักษณะดังกล่าวได้ การนำเทคโนโลยีชีวภาพโดยเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมาช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นจะทำให้ผลิตปทุมมาได้รวดเร็วและช่วยเพิ่มมูลค่าทางการตลาด รวมทั้งลดข้อจำกัดของวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมที่ต้องใช้เวลานานและไม่สามารถปรากฏลักษณะบางอย่างที่ต้องการ โดยไม่กระทบต่อลักษณะที่ดีของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อพัฒนาการผลิตปทุมมาให้มีคุณภาพและให้ผลผลิตที่ดีและมีบทบาทสำคัญในเชิงพาณิชย์มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการถ่ายยีนในปทุมมา
2. ศึกษาแนวทางในการถ่ายยีนสู่ปทุมมา
3. ศึกษาหาสภาพที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนในปทุมมา
4. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ถ่ายสู่ปทุมมา

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้จากส่วนต่างๆ ที่ทำให้เกิดจำนวนพืชต้นใหม่คือชิ้นส่วนพืช (explants) ในปริมาณที่มากและเหมาะสมต่อการถ่ายยีน
2. ศึกษาแนวทางในการถ่ายยีน สภาพที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน และการแสดงออกของยีนที่ถ่ายสู่ปทุมมา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชิ้นส่วนพืชและวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อการถ่ายยีน
2. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนในปทุมมา
3. สามารถนำวิธีการถ่ายยีนจากการศึกษานี้ไปใช้ถ่ายยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการถ่ายทอดสู่ปทุมมาและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการถ่ายยีนในพืชใกล้เคียงชนิดอื่นได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae อยู่ในสกุล *Curcuma* (สุรวิษ, 2539) Tribe Hedychieae (Dahlgren et al., 1985) พืชในสกุลนี้มีอยู่ไม่น้อยกว่า 70 ชนิด ในประเทศไทยพบประมาณ 30 ชนิด ซึ่งกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยในระดับความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร (พิมพ์ใจ และคณะ, 2539) โดยปลูกเป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก (Bunya et al., 2004) ในรายงานของ Sandararaj and Thulasidas (1976) พบว่าพืชในสกุล *Curcuma* มีลักษณะหัวค่อนข้างกลม และจะเกิดหัวขนาดเล็กจากตาที่อยู่ด้านล่าง พืชในสกุล *Curcuma* แบ่งตามลักษณะของใบประดับ ช่อดอก และอับเรณู ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *Eucurcuma* เป็นกลุ่มที่ไม่มีสีม่วงแดงที่ปากกลีบสเทมิโนค ปากมีสีขาวเหลือง ช่อดอกมีทั้งเกิดจากเหง้าโดยตรงและเกิดจากลำต้นเทียม และกลุ่ม *Paracurcuma* เป็นกลุ่มที่มีสีม่วงแดงที่ปากกลีบสเทมิโนค ปากมักมีสีขาวหรือสีม่วง ช่อดอกเกิดจากตาของลำต้นเทียม (สุรวิษ, 2539) ปทุมมาอยู่ในกลุ่ม *Paracurcuma* มีลำต้นเทียม (pseudostem) ที่เกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบ ลำต้นเทียมนี้เกิดจากการเจริญเติบโตของตาข้างของเหง้า (Chittenden and Synge, 1981)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ใบ: เป็นใบเดี่ยว มีแผ่นใบยาวรีสีเขียว เส้นกลางใบมีสีน้ำตาลเรื่อๆ ขอบใบเรียบ ขนาดใบกว้าง 4 – 5 เซนติเมตร ยาว 30-35 ใบ เกิดจากส่วนของลำต้นใต้ดิน

ลำต้น: ส่วนของลำต้นที่เห็นเหนือดิน คือลำต้นเทียมที่มีลักษณะเป็นกาบ ทำหน้าที่เป็นก้านใบและห่อหุ้มส่วนของก้านดอกด้วย ความสูงของต้นวัดจากโคนต้นถึงปลายใบบนสุดประมาณ 50-70 เซนติเมตร เมื่อต้นเริ่มแก่ส่วนของโคนลำต้นใต้ดินจะโป่งออกด้านข้างและเปลี่ยนไปเป็นหัวในที่สุด

หัว: มีลักษณะป้อม และโป่งออกด้านข้างมากกว่าที่จะเรียวยาว สามารถเห็นข้อและปล้องที่หดสั้นได้อย่างชัดเจน มีตาที่เรียงตัวอยู่ในแนวเดียวกัน 3-5 ตาต่อหัว

ดอก: มีลักษณะเป็นช่อแทงออกมาจากส่วนกลางลำต้นที่หุ้มไว้ด้วยกาบใบ เนื่องจากปทุมมามีก้านช่อดอกยาวจึงทำให้ช่อดอกสูงโศกเด่นอยู่เหนือลำต้น ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับเป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก ความยาวช่อดอกวัดจากโคนถึงปลายช่อประมาณ 60-75 เซนติเมตร

ช่อดอก: ประกอบด้วยกลีบประดับเรียงซ้อนกันเป็นระเบียบ โดยกลีบประดับส่วนล่างและส่วนบนจะมีสีและลักษณะแตกต่างกัน กล่าวคือกลีบประดับส่วนล่างจะมี 8-10 กลีบ สั้นและมีสีเขียว ส่วนโคนของกลีบประดับนี้จะเชื่อมต่อกัน แต่ตรงปลายมีลักษณะป้านแผ่ออกเป็นช่องทำให้น้ำขังได้ดี กลีบประดับส่วนบนมีขนาดใหญ่สีม่วงอมชมพูเรียงซ้อนกันคล้ายดอกบัว ดูสวยสะดุดตาคล้ายกลีบดอก โดยทั่วไปกลีบประดับส่วนบนมี 12-15 กลีบ ซึ่งความงามของปทุมมาจะอยู่ที่รูปทรงและสีของกลีบประดับส่วนบน

สำหรับดอกที่แท้จริงจะเกิดอยู่ที่ซอกของกลีบประดับส่วนล่าง และในบางส่วนของกลีบประดับส่วนบนแต่ก็จะเป็นหมัน ดอกจริงมีประมาณ 3-4 ดอกต่อกลีบประดับ แต่จะทยอยบานทีละดอก และบานเพียง 1 วันเท่านั้น ดอกจริงยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ประกอบด้วย 6 กลีบดอก แบ่งเป็นชั้นนอก 3 กลีบและชั้นใน 3 กลีบ กลีบดอกมีสีขาว ยกเว้นกลีบล่างที่มีลักษณะเหมือนปากมีสีม่วงเข้มเรื่อๆและสีเหลืองตรงกลาง ดอกของปทุมมาเป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้ประกอบด้วยก้านเกสรตัวผู้ ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเชื่อมติดกับฐานอับละอองเกสรเชื่อมติดกันเป็นหลอดล้อมก้านชูเกสรตัวเมีย ละอองเกสรตัวผู้มีลักษณะกลมและเหนียวจับกันเป็นก้อน ยอดเกสรตัวเมียเป็นแบบปลายบิดคล้ายปากแตรชูอยู่เหนืออับละอองเกสร รังไข่มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ภายในแบ่งเป็น 3 ช่องมีไข่อ่อน ลักษณะคล้ายเมล็ดถั่ว 40-50 อันเกาะติดที่แกนกลางของรังไข่

ราก: ลักษณะอวบ ขาว แบ่งเป็น 2 ประเภทคือรากค้ำจุนและหาอาหารกับรากสะสมอาหาร โดยรากสะสมอาหารมีปลายรากเป็นตุ่มสีขาว ซึ่งเก็บสะสมอาหารไว้ใช้ในช่วงพักตัวเพื่อรองอกในฤดูต่อไป

เมล็ด: เมล็ดมีรูปร่างยาวรี มีเปลือกแข็งหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล ปกติแล้วเมล็ดจะเริ่มแก่เมื่อช่อดอกเริ่มแห้ง แต่เมล็ดมักจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ (วิภาดา และ พิพัฒน์, 2537)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ประสิทธิภาพและกระบวนการพัฒนาไปเป็นยอดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีน ซึ่งชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาใช้ในการถ่ายยีนนั้นต้องมีประสิทธิภาพในการเกิดยอดใหม่ได้ดีและรวดเร็วมีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนพืชมาก แต่ในการเลือกใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับสภาพของเนื้อเยื่อ โดยทั่วไปชิ้นส่วนที่ใช้เป็นชิ้นส่วนตั้งต้น ได้แก่ ช่อดอกอ่อน และชิ้นส่วนของตาข้าง ข้อดีของการเลือกใช้ชิ้นส่วนตาข้างในการทดลองเนื่องจากเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีอายุน้อย สามารถเกิดการพัฒนาค้นใหม่ได้ง่ายอีกทั้งมีการสะสมเชื้อโรคน้อย สำหรับการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมากับดินทำได้โดยการนำหัวปทุมมามาสางทำความสะอาดและแช่น้ำยาป้องกันเชื้อราแล้วปล่อยให้ตาพัฒนาเองในสภาพปกติ เช่นเดียวกับ Wannakrairoj (1997) ได้ใช้วิธีที่จะช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี โดยนำส่วนของหัวปทุมมาล้างให้แห้งก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์และทำ pretreatment ในน้ำอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 – 10 นาที นอกจากนี้ วราภรณ์ (2547) ได้ศึกษาหาวิธีการฟอกชิ้นส่วนตาชอดเพื่อหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม และพบว่าเมื่อฟอกชิ้นส่วนตาชอดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ที่มีคลอรีนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด คือ 33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากการใช้ส่วนตาข้างแล้วการใช้ส่วนของช่อดอกอ่อนเป็นชิ้นส่วนตั้งต้นในการทดลองจะช่วยแก้ปัญหาการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี มีรายงานความสำเร็จในการพัฒนาไปเป็นยอดของ *Curcuma* sp. จากชิ้นส่วนตั้งต้นที่ใช้สำหรับการทดลองที่แตกต่างกัน Wannakrairoj (1997) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนและตาข้างในปทุมมา Prakash et al. (2004) รายงานความสำเร็จของการเกิดต้นใหม่ทั้งโดยทางตรง (direct) และทางอ้อม (indirect) ของ *Curcuma amada* จากชิ้นส่วนของ rhizome และกาบใบ นพมณี และคณะ (2545) ได้ใช้ส่วนของช่อดอกอ่อนเป็นชิ้นส่วนตั้งต้น โดยช่อดอกอ่อนระยะที่ดีที่สุดนั้นควรเป็นช่อดอกที่เพิ่งเกิดจากลำต้นเทียมและใบประดับจะต้องอยู่ในสภาพที่ปิด (พรรณธิดา, 2543) ทิพย์สุดา (2540) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดหรือต้นใหม่ของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 (*Curcuma aurantiana* Van Zijp) โดยใช้ชิ้นส่วนจากช่อดอกอ่อนและตาหน่อ นอกจากนี้ สุพัตรา (2541) ใช้ชิ้นส่วนรอยต่อระหว่างรากกับลำต้นของต้นอ่อนกระเจียว (*Curcuma* sp.) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อศึกษาผลการเจริญเติบโตของแคลลัสและเซลล์แขวนลอย และได้มีการใช้ชิ้นส่วนปลายยอดจากตาข้างในการขยายพันธุ์คาหลา (อภิชาติ, 2539)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมา มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเกิดจำนวนต้นเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน จากรายงานของ Wannakrairoj (1997) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนและตาข้างปทุมมาโดยนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA หรือ Kinetin และน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างที่แบ่งตามยาวเลี้ยงบนอาหารแข็งร่วมกับการเติม BA 13.32 μM สามารถชักนำให้เกิดต้นมากที่สุดเท่ากับ 4.83 ต้นต่อชิ้นส่วน และในแต่ละระดับความเข้มข้นของน้ำตาลให้ผลไม่แตกต่างกัน วราภรณ์ (2547) ศึกษาการผลิตหัวปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายจำนวนต้น คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนต้นเฉลี่ยเท่ากับ 2.8 ต้นต่อชิ้นส่วน Prakash et al. (2004) ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดต้นใหม่ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมของ *Curcuma amada* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นส่วนของ rhizome เลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BA 4.4 μM และ NAA 1.08 μM ทำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุด และจากการใช้ส่วนกาบใบ (leaf sheath) เลี้ยงบนอาหาร MS ประกอบด้วย 2,4-D 9 μM มีการเกิดแคลลัสที่มีลักษณะใสก่อนย้ายลงบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 8.8 μM และ NAA 2.7 μM เพื่อชักนำให้เกิดต้นต่อไป ในรายงานของทิพย์สุตา (2540) ได้ทำการชักนำให้เกิดยอดหรือต้นใหม่โดยใช้ชิ้นส่วนจากช่อดอกอ่อนและตาหน่อของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 (*Curcuma aurantiana* Van Zijp.) โดยเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 1 เดือนพบว่า ชิ้นส่วนยอดและส่วนกลางช่อดอกอ่อนสามารถชักนำให้เกิดต้นเฉลี่ย 0.7 – 1.7 ต้นต่อชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงตาตำแหน่งที่ 2 จากโคนหน่อบนอาหารที่มี BAP 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นเฉลี่ย 0.8 - 2.2 ต้นต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ได้มีการศึกษาสถานะของอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดของ *Curcuma longa* ซึ่งในรายงานของ Prathanthurarug et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของ *Curcuma longa* โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนของตาในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 72.64 μM เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีอัตราการเพิ่มจำนวนเป็น 11.4 ± 1.7 ยอดต่อชิ้นส่วน Choi and Kim (1993) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของขิง และใช้ชิ้นส่วนปลายยอดเป็นชิ้นส่วนตั้งต้นในการทดลอง โดยเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่มีความเข้มข้น BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้น NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ปลายยอดสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้จำนวนมากที่สุด ในรายงานของ Barthkur and Bordoloi (1994) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นของขิงพันธุ์ Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb) โดยนำส่วนเหง้ามาเลี้ยงบนอาหารมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ประกอบด้วย NAA และ BA ความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 1 เดือนพบว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ

BA 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดขอดและรากเป็นจำนวนมาก นอกจากการใช้ชิ้นส่วนตาและ ส่วนปลายขอดเป็นชิ้นส่วนตั้งต้นแล้ว ยังพบการใช้ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนของขิง (*Zingiber officinale* Rosc) ที่ปรากฏในรายงานของ Babu และคณะ (1993) ได้นำชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนอายุ 1-10 วันเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี 2,4-D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ กันเป็นเวลา 1 เดือนและพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเกิดขอดจะเกิดได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ อภิชาติ (2539) ได้ใช้ชิ้นส่วนปลายขอดจากหน่อข้างในการขยายพันธุ์คาหลา โดยการนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA

การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Transgenic plant)

การถ่ายฝากยีนในพืชทำได้หลายชนิดแล้ว เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้รองรับการถ่ายยีนมีความก้าวหน้ามาก โดยสามารถเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ราก กิ่ง ลำต้น ดอก อับละอองเกสร กัณธะ จนถึงกลุ่มเซลล์ และโปรโตพลาสต์จนเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เทคนิคที่จะนำมาใช้ในการถ่ายฝากยีนในพืชมีหลายวิธี เช่น การถ่ายยีนโดยใช้ กระแสไฟฟ้า เข็มฉีดยา เครื่องยิงอนุภาค และใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (สุรินทร์, 2545) ซึ่งการถ่ายฝากยีนเป็นวิธีการหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อถ่ายทอดลักษณะโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ลักษณะที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม นอกจากนี้การถ่ายยีนเป็น การทำลายหรือแก้ปัญหาคือจำกัดเกี่ยวกับการผสมระหว่างพืชต่างชนิด การถ่ายยีนใหม่เข้าไปใน พืชทำให้ต้นพืชมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ต้านทานโรค แมลง และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่ เหมาะสม การผลิตไม้ดอกที่มีรูปแบบและสีแปลกใหม่โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม เพื่อให้ เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะที่ไม่สามารถจะใช้วิธีธรรมดาทั่วๆ ไปได้ โดยใช้เทคนิคการ ถ่ายฝากยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์เป้าหมาย เมื่อเซลล์พืชเจริญไปเป็นต้นก็จะให้ดอกที่มีสีและ รูปร่างตามลักษณะที่ต้องการได้ (คณัย และ อังสนา, 2540)

การถ่ายยีนในพืช

องค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างพืชตัดต่อสารพันธุกรรมหรือคัดแปลงทางพันธุกรรมที่จะทำให้ได้รับความสำเร็จในการปรับปรุงหรือสร้างพันธุ์พืชใหม่ที่ดี

1. การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อชักนำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนพัฒนาเป็นต้นพืชต่อไป

2. การเตรียมชุดยีน (gene construct) คลอจยพาหะ (vector) ที่จะนำยีนเข้าไปในเซลล์หรือโครโมโซมของพืชที่เหมาะสม

3. การถ่ายยีนเข้าในเซลล์พืช

4. การเพิ่มปริมาณพืชตัดต่อสารพันธุกรรม

5. ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน (gene expression) ในพืชตัดต่อสารพันธุกรรม

6. ยีนที่ได้รับการถ่ายเข้าไปในพืชตัดต่อสารพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดไปสู่ชั่วรุ่นต่อไปได้

การพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้พืชตัดต่อสารพันธุกรรม (transgenic plant) ซึ่งเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นต้องมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ โดยกระบวนการพัฒนาเป็นต้นพืชมี 2 ชนิด คือ การเกิดยอดและการเกิดเอ็มบริโอ ข้อสำคัญของการพัฒนาเป็นต้นพืชตัดต่อสารพันธุกรรมนั้น ยอดต้องพัฒนาจากเซลล์น้อยเซลล์ เพื่อป้องกันการเกิดพืชที่มีความหลากหลายพันธุกรรมอยู่ด้วยกัน ปัจจุบันนิยมใช้ somatic embryo หรือ embryogenic callus เป็นชิ้นส่วนของพืชในการถ่ายยีนโดยการใช้อะโกรแบคทีเรียหรือเครื่องยิงอนุภาค โดยทั่วไปแล้วข้อได้เปรียบของการใช้ยอด คือ ยอดมีอัตราการเพิ่มปริมาณสูง มีเซลล์ต้นกำเนิดน้อยเซลล์ เนื่องจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมานั้นจะเกิดขึ้นบริเวณที่มีตำแหน่งเฉพาะและถ่ายยีนได้จำนวนน้อยเซลล์ จากนั้นจึงทำการชักนำให้เกิดต้นต่อไป นอกจากนี้ต้นอ่อนที่ได้จากการใช้ยอด มีทั้งยอด และราก สะดวกต่อการนำไปปลูก (การเตรียมชุดยีน, 2549)

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

โดยทั่วไปแล้วการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย จะให้จำนวนชุดของยีนที่เข้าไปใน genome พืชมีจำนวนน้อยชุด มีการแทรกของยีนเข้าไปใน genome พืชที่แน่นอนและมีการจัดเรียงตัวใหม่น้อยกว่าและมีการแสดงออกที่คงที่กว่าวิธีการถ่ายยีนโดยตรง (Hu et al., 2003)

อะโกรแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้น เรียกว่า crown gall disease เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของอะโกรแบคทีเรียจะมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบสถูกถ่ายทอดเข้าไป และแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T (transferred) DNA พลาสมิด Ti มีส่วนประกอบดังนี้ มีส่วนของ virulence (vir) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช T-DNA ซึ่งภายในมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน ส่วนอื่นๆ คือ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล (ORI) ส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลาสมิดและยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารบางชนิดเป็นแหล่งพลังงานได้ เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจึงสามารถสร้างสารโอปีนขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วนอะโกรแบคทีเรียก็สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไปพืชจะยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวร ดังนั้นจึงอาศัยความสามารถในการส่งส่วนของ DNA เข้าสู่พืชมาใช้ในการส่งถ่ายยีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช โดยการตัดแปลง T-DNA โดยทำการนำส่วนที่ทำให้เกิดโรคออกและนำยีนที่สนใจตัดต่อใส่เข้าไปแทน (สุรินทร์, 2545)

ส่วนประกอบของ T-DNA

ในส่วนของ T-DNA นอกจากจะมียีนที่สังเคราะห์สารโอปีนแล้วยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนินด้วย เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้

ขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืชกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ (terminal repeat) 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB)

กลไกการส่งถ่ายยีนโดยรวมคล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ conjugation ของแบคทีเรียกระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบ phenolic จากพืช คือ acetosyringone (AS) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งโครโมโซมของแบคทีเรีย และ vir gene ที่อยู่บนพลาสมิด Ti โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน vir D ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบดีเอ็นเอสาย

เดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางขวา (RB) ไปเรื่อยๆ ส่วน RB นี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าจะไม่มีส่วน LB การส่ง T-strand ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอน เพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันนี้สามารถผลิตพืชที่มีการคัดต่อสารพันธุกรรมได้หลายชนิด ปัจจัยสำคัญของการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียคือ ชิ้นส่วนพืชต้องสามารถผลิตสารประกอบที่เป็น phenolic compound ได้ และอะโกรแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเข้าทำลายพืชแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับ vir gene โดยเฉพาะ vir A และ vir G ที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหรือถ่ายยีนของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเพิ่มชุดจำนวนของ vir G gene ในแบคทีเรียสามารถเพิ่มความสามารถในการเข้าทำลายตลอดจนเพิ่มชนิดพืชที่เป็นเจ้าบ้านได้

ปัจจัยสำคัญอื่นๆในการเพิ่มประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

1. ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นพืชของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณรอยต่อของชิ้นส่วนพืช)
2. อะโกรแบคทีเรียสามารถถ่ายยีนได้มากเซลล์
3. ในการคัดเลือกและเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนต้องป้องกันเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเพิ่มปริมาณหรือพัฒนาเป็นต้นพืช

กระบวนการส่งถ่ายยีนจากอะโกรแบคทีเรียไปยังเซลล์พืช

1. ผลผลิตของยีน *chv A* และ *chv B* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียทำให้เซลล์ของ แบคทีเรียเข้าไปเกาะกับเซลล์ของพืชที่มีบาดแผล
2. พืชสังเคราะห์สาร acetosyringone (AS) แล้วปล่อยเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย
3. โปรตีนจากยีน *vir A* จับกับสาร AS ได้และร่วมกับสารนี้ไปกระตุ้นให้ยีน *vir G* ทำงาน
4. สาร AS และ โปรตีนจากยีน *vir G* ไปกระตุ้นให้มีการลอกรหัสของยีนที่เหลือ
5. โปรตีนจากยีน *vir D* ซึ่งเป็นเอนไซม์ endonuclease ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง RB และ LB
6. เกิด T-DNA สายเดี่ยวหรือ T-strand
7. T-strand เข้าไปในเซลล์พืชและไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช
8. เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ในส่วนของ T-DNA
9. สารออกโทปินเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

10. สารออกโทปินไปเหนี่ยวนำให้เกิดการลอกหลุดของยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์เพื่อใช้สารนี้เป็นแหล่งพลังงาน (octopine catabolism) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งถ่าย พลาสมิดให้แก่แบคทีเรียด้วยกัน (*Tra*)

11. แบคทีเรียเจริญเติบโต โดยใช้สารออกโทปินเป็นแหล่งพลังงานและเกิดการ conjugation ระหว่างแบคทีเรียเพื่อถ่ายพลาสมิด Ti ให้แก่เซลล์ที่ไม่มี (สุรินทร์, 2545)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนในพืช

ความสำเร็จในการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ เนื้อเยื่อนำมาถ่ายยีน วิธีการและสภาวะในการถ่ายยีน ความเข้มข้นของ acetosyringone ชนิดของพลาสมิด สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรีย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่จะช่วยส่งเสริมให้การถ่ายยีนประสบความสำเร็จ

ในรายงานของ Hiei and Komari (1997) พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้แก่ ชนิดของพืช ชนิดและอายุของเนื้อเยื่อที่ใช้ทำการทดลอง ชนิดของเวกเตอร์ สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรีย ระบบการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีน และการเลือกใช้ชิ้นเครื่องหมายรวมถึงสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการเลือกชิ้นส่วนของพืชและเนื้อเยื่อนำมาใช้ในการถ่ายยีนนั้นมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีน และการเลือกใช้ชิ้นส่วนก็มีความแตกต่างกันในแต่ละพืช โดยชิ้นส่วนดังกล่าวที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนจะต้องมีประสิทธิภาพในการพัฒนาไปเป็นต้นภายหลังจากการถ่ายยีนได้เป็นอย่างดี เช่น ใน *Agapanthus* จากการศึกษาของ Suzuki et al. (2001) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อ embryogenic callus และในคาร์เนชัน Nontaswatsri et al. (2004) พบว่าการใช้ชิ้นส่วนใบและข้อ เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียในกล้วยไม้ฟาแลนนอปปซิส Chai et al. (2002) ประสบความสำเร็จจากการใช้ protocorm – like bodies (PLBs) ในการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรีย และ Aida (1999) ใช้ชิ้นส่วนก้านใบของ cyclamen ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพมืดจะทำให้การถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียประสบความสำเร็จมากขึ้น Godoy – Hernandez et al. (2006) ใช้ชิ้นส่วน hypocotyls ราก ใบ และปลายยอดของดาวเรืองในการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย Hiei and Komari (2006) ใช้ชิ้นส่วนของ embryos ที่ยังพัฒนาไม่เต็มที่ที่เจริญเติบโตในสภาพเรือนกระจกสำหรับการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย ในขณะที่ Hoque et al. (2005) พบว่าการใช้ embryos ที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่สำหรับการถ่ายยีนในข้าวสาลีพันธุ์ Indica จะทำให้ได้รับต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนมากกว่าการใช้ embryo ที่แก่ และพบว่า แคลลัสที่ได้จาก embryo ที่แก่ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ดีที่สุด นอกจากนี้ Yan and Wang (2007) ใช้ชิ้นส่วนของแผ่นใบที่ทำให้เกิดแผลมีรูปร่างกลม

(leaf disc) และ Winkelmann et al. (2005) ใช้ชิ้นส่วนของใบและก้านใบของเจราเนียมที่ยังไม่มี การพัฒนาเป็นดอกที่ได้จากสภาพโรงเรือนสำหรับการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

นอกจากการเลือกใช้เนื้อเยื่อที่ได้มีการกล่าวมาข้างต้นแล้วนั้น สภาพของพืชที่ได้ จากสภาพแวดล้อมที่ต่างกันคือ ในสภาพโรงเรือนและในสภาพปลอดเชื้อก็มีผลต่อความสำเร็จใน การถ่ายยีนเช่นเดียวกัน Boase (1998) กล่าวว่าสภาพของพืชที่ได้จากโรงเรือนมีข้อจำกัดในการนำ ชิ้นส่วนพืชมาใช้ในการถ่ายยีน เนื่องจากในบางครั้งถ้าการฟอกทำความสะอาดชิ้นส่วนพืชไม่ดีจะ ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทำให้ชิ้นส่วนพืชตายเป็นจำนวนมาก และการใช้ ชิ้นส่วนใบอ่อนที่ได้จากสภาพโรงเรือนหลังจากฟอกด้วยคลอโรกซ์ แล้วทำการปลูกเชื้อด้วยอะโกร แบคทีเรียทำให้ได้รับพืชที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวนน้อยหรือไม่ได้รับพืชถ่ายยีนเลย หรือ กระบวนการเกิดต้นใหม่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนภายในพืช กับฤดูกาลในระหว่างทำการทดลอง

การพัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และ การปรับสภาพการถ่ายยีนให้เหมาะสมต่อการเข้าบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยการใช้สาร phenolic เช่นเดียวกับที่พืชปล่อยออกมาขณะเกิดบาดแผลก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีความสำคัญต่อ ความสำเร็จในการถ่ายยีน Suzuki et al. (2001) พบว่าการให้ acetosyringone ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกันสำหรับการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย ใน *Agapanthus* จะทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพมากที่สุด ในรายงานของ Hoque et al. (2005) พบว่าการให้ acetosyringone ความเข้มข้น 200 μM ในระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วมกันสำหรับการ ถ่ายยีนในข้าวสาลีพันธุ์ Indica จะทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูงสุด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชก่อนทำการถ่ายยีน (preculture) Nontaswatsri et al. (2004) กล่าวว่าจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในคาร์เนชั่นก่อนทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 และ 5 วัน ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีกว่าการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน Aida (1999) ได้ทำการ เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบ cyclamen บนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AS ความเข้มข้น 100 μM ในสภาพมืดเป็นเวลา 6 วันก่อนทำการ ถ่ายยีน จะทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพมากที่สุด Herath et al. (2005) พบว่าการทำให้เกิดแผล บนชิ้นส่วนและการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของปอชวาก่อนทำการปลูกเชื้อบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 8 μM เป็นเวลา 2 วันจะทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน *gus* และยังพบว่า การเพิ่มระยะเวลาการ เพาะเลี้ยงก่อนทำการปลูกเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงร่วมกันทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน *gus* ได้มากยิ่งขึ้น

สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรีย ชนิดของพลาสมิดที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนก็มีความแตกต่างกัน Suzuki et al. (2001) ศึกษาการใช้อะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ EHA101/pIG121Hm และ LBA4404/pTOK233 ที่ใช้ถ่ายยีนใน *Agapanthus* พบว่าอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ LBA4404/pTOK233 ทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพมากที่สุด Nontaswatsri et al. (2004) ศึกษาการถ่ายยีนในคาร์เนชั่นโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย AGLO ซึ่งมีพลาสมิด pKT3 ประกอบด้วย β -glucuronidase(*gus*) neomycinphosphotransferase(*nptII*) Godoy - Hernandez et al. (2005) ศึกษาการถ่ายยีนในดาวเรืองโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 2301 ประกอบด้วย β - glucuronidase (*gus*) ที่เป็นยีนรายงานผลในพืชที่ได้รับการถ่ายยีน และ neomycinphosphotransferase (*nptII*) เป็นยีนคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ Hiei et al. (2006) ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์ Indica โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ซึ่งมีพลาสมิด pTOK223 หรือ pSB134 ซึ่งมียีนที่ต้านยาปฏิชีวนะ hygromycin และยีน *gus* ที่ใช้เป็นยีนรายงานผล

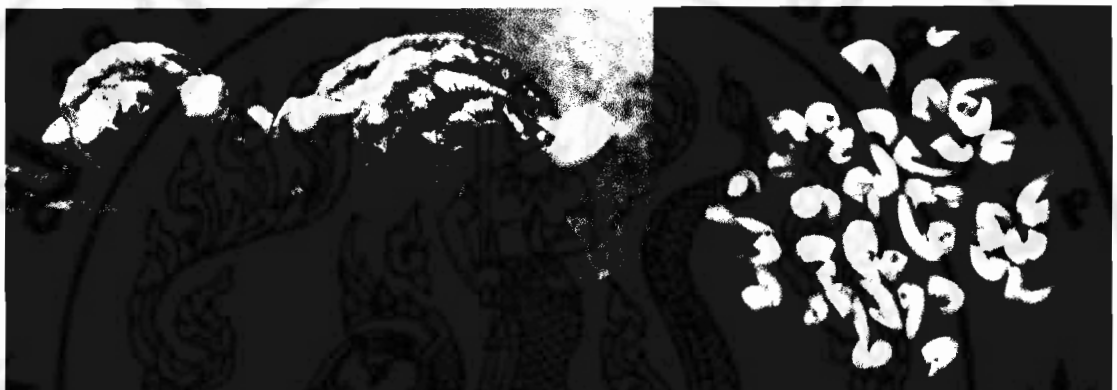
วิธีการปลูกเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม Nontaswatsri et al. (2004) ศึกษาการถ่ายยีนในคาร์เนชั่น พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงร่วมเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้ชิ้นส่วนข้อ ซึ่งในการทดลองใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน และวิธีการปลูกเชื้อเหมือนกันแต่ใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงร่วมแตกต่างกัน คือในสภาพที่มีอาหารและในสภาพที่ขาดอาหารพบว่า ในสภาพที่ไม่มีอาหารโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนกระดาศกรองที่ชุ่มน้ำหรือน้ำ และ acetosyringone (AS) ทำให้การถ่ายยีนประสบความสำเร็จได้ดีกว่าในสภาพที่มีอาหาร Aida et al. (1999) ทำการถ่ายยีนโดยจุ่มชิ้นส่วนก้านใบ cyclamen ในสารละลายอะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 5 นาที แล้วจับให้แห้งบนกระดาศกรอง จากนั้นวางชิ้นส่วนบนกระดาศกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วที่วางบนอาหารเดิมเป็นเวลา 6 วัน Suzuki et al. (2001) ทำการถ่ายยีนใน *Agapanthus* โดยนำ embryogenesis calli จุ่มในสารละลายอะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 1 นาทีและจับให้แห้งบนกระดาศกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วม 3 7 และ 10 วัน บนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย PIC 1 มิลลิกรัมต่อลิตร sucrose 30 กรัมต่อลิตร gellan gum 2 กรัมต่อลิตร ที่ไม่เค็มและเค็ม acetosyringone 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในสภาพมืดพบว่าการเพาะเลี้ยง embryogenesis calli ร่วมกับอะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน และเค็ม acetosyringone 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพทำให้ได้จำนวน callus ที่ต้านทานต่อสาร hygromycin มากที่สุด Hiei et al. (2006) ได้ทำการปลูกเชื้อโดยใช้วิธีหดยอด สารละลายอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วย acetosyringone 0.1 mM ที่ปรับค่าความหนาแน่นของ bacteria ประมาณ 3×10^9 CFU /ml ปริมาตร 5 μ l บน embryo ที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยจะวางส่วนของ scutellum ขึ้น จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียสในสภาพมืดเป็นเวลา 7 วัน Winkelmann et al. (2005) ได้ทำการปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนของก้านใบจุ่มในสารละลายอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วย acetosyringone 0.05 mM เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นซับให้แห้งบนกระดาษกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วและวางชิ้นส่วนบนอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกันที่ประกอบด้วย TDZ 10 μ M เป็นเวลา 2 และ 4 วันก่อนย้ายลงบนอาหารคัดเลือกต่อไป ในรายงานของ Yan and Wang (2007) ได้ทำการปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนของใบที่ทำให้เกิดแผลมีรูปร่างเป็นวงกลม (leaf discs) ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA 6.6 μ M และ NAA 0.5 μ M เป็นเวลา 1 วัน โดยทำการจุ่มในสารละลายอะโกรแบคทีเรีย และทำการเขย่าเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นซับแบคทีเรียส่วนเกินออกและทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันโดยเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียสก่อนย้ายไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกต่อไป นอกจากนี้ Godoy - Hernandez et al. (2005) ได้ทำการปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนของ hypocotyls รากที่มีความยาว 10 มิลลิเมตร แผ่นใบขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร และปลายยอดที่ได้จากต้นกล้าที่มีอายุ 10 วันในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นทำให้เกิดแผลตื้นๆ ตามยาวด้วยมีดผ่าตัด จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนในสารละลายอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วย AS 100 μ M ปริมาตร 20 ml เป็นเวลา 15 นาทีแล้วทำการกำจัดแบคทีเรียส่วนเกินออกโดยซับให้แห้งบนกระดาษกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วและย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย IAA 1 μ M และ BA 5 μ M (pH 5.2) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนย้ายเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกต่อไป

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมา

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ ชิ้นส่วนตาข้างของปทุมมาขนาดยาว 3.0 เซนติเมตร และช่อดอกอ่อนของปทุมมาขนาดความยาว 9 - 10 เซนติเมตร ซึ่งสายพันธุ์ปทุมมาที่นำมาใช้ในการศึกษามีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์สโนว์ไวท์ เชียงใหม่ไวท์ ช่อมรกต เชียงใหม่พิงค์ และเชียงใหม่เรด



ภาพ 1 ชิ้นส่วนตาข้างของปทุมมาขนาดยาว 3.0 เซนติเมตร



ภาพ 2 ช่อดอกอ่อนของปทุมมาที่ยังไม่บาน ขนาดความยาว 9 - 10 เซนติเมตร

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ ปีกเกอร์ กระจกบดว ขวดแก้วสำหรับบรรจุอาหาร ปิเปต (pipette) จานแก้ว (petri dish) มีดผ่าตัด เข็มเย็บ ปากคิบ เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) เครื่องขังสาร เครื่องคนสาร (magnetic stirrer) หม้อนึ่งความดันไ (autoclave) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air – flow cabinet)

สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ คลอรีนซ์ที่มีความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 6- Benzylaminopurine (BA) Naphthaleneacetic acid (NAA) และ Indole -3- acetic acid (IAA)

สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมา คือ สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

ตาราง 1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
KH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Na ₂ - EDTA	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85

ตาราง 1(ต่อ)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine- HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง คือ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 2201 ที่มียีน β - glucuronidase (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน neomycinphosphotransferase (*nptII*) เป็นยีนที่ใช้คัดเลือกในพืช และพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 พลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ที่มียีน β -glucuronidase (*gus*) เป็นยีนรายงานผลและยีน hygromycinphosphotransferase (*hptII*) เป็นยีนที่ใช้คัดเลือกในพืชที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S promoter

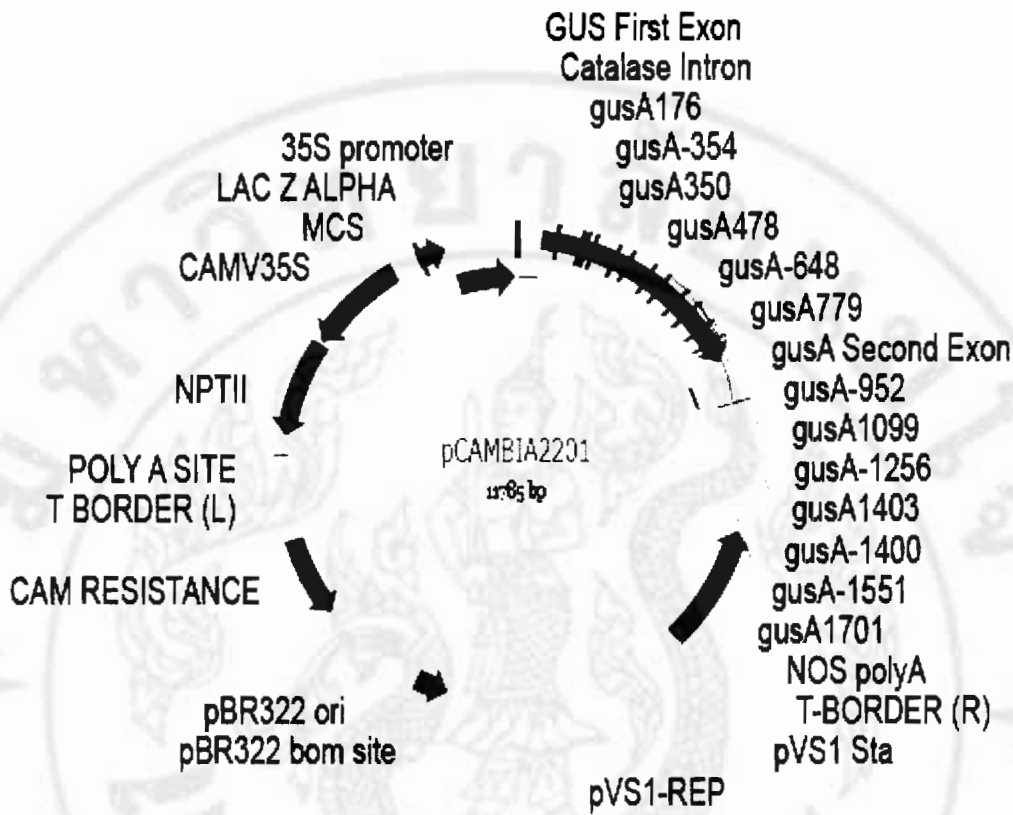
สูตรLuria-Bertain (LB); ประกอบด้วย tryptone 10 กรัมต่อลิตร yeast extract 5 กรัมต่อลิตร NaCl 10 กรัมต่อลิตร

สารปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และRifampicin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย Acetosyringone (AS) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล

สารละลาย X- Gluc ซึ่งประกอบด้วย 0.5 mM 5 - bromo - 4 - chloro-3 indolyl - β - D- glucuronide - cyclohexy 0.5 mM Ferri/Ferro และ ethanol 20 % ใน 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) กับ 0.3% Triton X-100

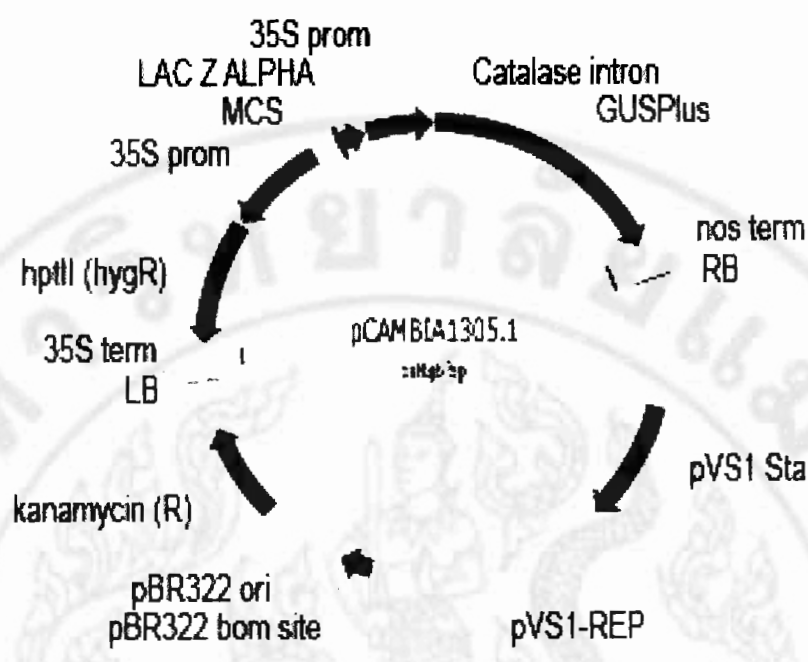
พลาสมิด pCAMBIA 2201



ภาพ 3 พลาสมิด pCAMBIA 2201

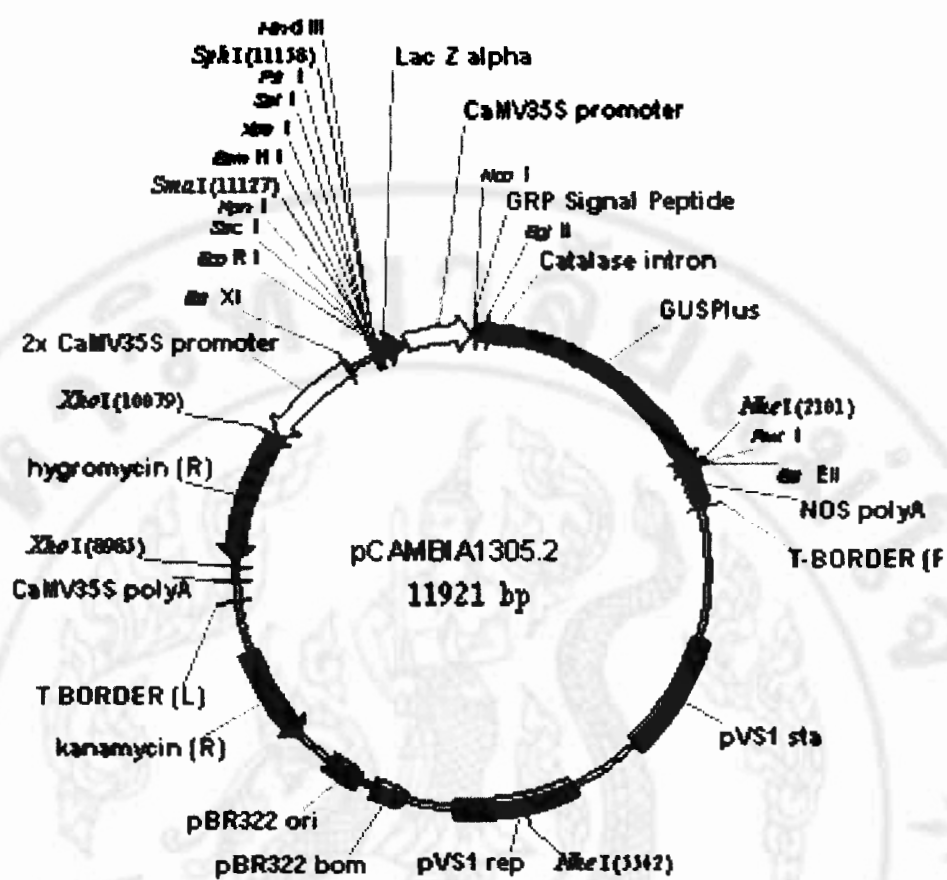
ที่มา: <http://www.cambia.org.au/daisy/cambia/2065/version/1/part/4/data/pCAMBIA2201.pdf?branch=main&language=default>

พลาสมิด pCAMBIA 1305.1



ภาพ 4 พลาสมิด pCAMBIA 1305.
ที่มา: <http://www.cambia.org.au/daisy/cambia/2050/version/1/part/4/data/pCAMBIA1305.1.pdf>
=main&language=default

พลาสมิด pCAMBIA 1305.2



ภาพ 5 พลาสมิด pCAMBIA 1305.2

ที่มา: www.cls.zju.edu.cn/.../pcambia1305series.htm

วิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยสายพันธุ์ปทุมมาที่นำมาทำการศึกษา มีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ เชียงใหม่ไวท์ ช่อมรกต เชียงใหม่พิงค์ และเชียงใหม่เรด โดยใช้ชิ้นส่วนกาบใบและส่วนช่อดอกอ่อนเป็นชิ้นส่วนตั้งต้น ในแต่ละสายพันธุ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งในแต่ละซ้ำจะใช้ชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนจำนวน 10 ชิ้น

วิธีการดำเนินงาน

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนกาบใบของปทุมมา

โดยเลือกตาข้างที่มีขนาดยาว 3.0 เซนติเมตรจากหัวพันธุ์ ตัดส่วนของตาออกจากหัว ทำการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นฟอกด้วยคลอรีนที่มีความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้งเป็นเวลา 10 นาที และฟอกด้วยคลอรีนที่มีความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที นำตาที่ได้มาแบ่งครึ่งตามยาวแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.75 เลี้ยงไว้ในตู้หมุ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นดึงกาบใบ (leaf sheath) ตามยาวโดยกาบใบแต่ละชิ้นจะต้องมีส่วนที่เป็นรอยต่อระหว่างฐานและกาบใบติดมาด้วย และตัดให้มีความยาวจากฐานใบประมาณ 0.3 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.75

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่อดอกอ่อนของปทุมมา

เลือกช่อดอกอ่อนที่มีขนาดความยาวจากฐานถึงปลายช่อดอก 9-10 เซนติเมตร ทำการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นฟอกด้วยคลอรีนที่มีความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้งเป็นเวลา 10 นาที และฟอกด้วยคลอรีนที่มีความเข้มข้นของ

Sodium hypochlorite 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วนดอกอ่อนที่ติดอยู่กับช่อดอก และเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.80 (พรรณริศา, 2543) เลี้ยงไว้ในตู้หมุ่ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

การเก็บข้อมูลประกอบด้วย

1. จำนวนวันตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่เริ่มเกิดยอดใหม่
2. จำนวนยอดใหม่ที่เกิด ซึ่งยอดใหม่ที่นับต้องมีความยาวมากกว่า 1 เซนติเมตร และมีใบจริงปรากฏอย่างน้อย 1 ใบ โดยเก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์
3. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ โดยคำนวณจากชิ้นส่วนที่เกิดยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด $\times 100$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกต โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 2 การศึกษาหาจุดกำเนิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนกาบใบและชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน

วิธีการดำเนินงาน

ใช้ชิ้นส่วนกาบใบจากตาของปทุมมาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 15 วัน นำกาบใบ (leaf sheath) มาล้างตามยาว และในส่วนของช่อดอกอ่อน ทำการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน นำมาล้างตามยาว จากนั้นเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 0 5 และ 10 วัน ตัดชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนตามขวางและตัดตามยาวโดยใช้มีดโกน ตัดโดยใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือข้างซ้ายจับตอนบนสุดของชิ้นส่วนที่จะตัด ส่วนนิ้วอื่นๆใช้บังคับชิ้นส่วนให้อยู่ภายในอุ้งมือและตั้งฉากกับใบมีด จากนั้นใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือข้างขวาจับใบมีดโกนโดยให้ด้านข้างของนิ้วชี้รองรับใบมีด นิ้วหัวแม่มือ

ประกอบให้มีขนาดเท่ากับพื้น ตัดโดยเลื่อนคมมีดเข้าหาหรือออกจากตัวแล้วแต่ถนัด ด้านข้างของปลายนิ้วชี้ข้างซ้ายจะช่วยบังคับความหนาของชิ้นส่วนที่ถูกตัดได้ ทำการย้อมชิ้นส่วนด้วยสี Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบจุดกำเนิดของโคโคมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด binocular microscope

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

การเก็บข้อมูล โดยทำการศึกษาจุดกำเนิดของโคโคมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของชิ้นส่วนกาบใบที่ตัดตามขวางและตัดตามยาว บันทึกภาพจุดกำเนิดของโคโคมด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล

การทดลองที่ 3 การศึกษาการตายเนื่องจากสารปฏิชีวนะ Kanamycin ของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้ชิ้นส่วนกาบใบจำนวน 50 ชิ้น พันธุ์ปทุมมาที่นำมาศึกษามี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ เชียงใหม่ไวท์ และเชียงใหม่พังก์

วิธีการดำเนินงาน

ตั้งกาบใบหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.75 เป็นเวลา 15 วันโดยให้มีรอยต่อบริเวณฐานติดมาด้วยและมีความยาววัดจากฐานกาบใบประมาณ 0.3 เซนติเมตร จากนั้นเลี้ยงกาบใบบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.75 ร่วมกับการเติม Kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ กัน

เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ Kanamycin เท่ากับ 0 20 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบร่วมกับ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวพบว่าปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์อ่อนแอต่อ Kanamycin มากคือชิ้นส่วนของพืชจะตายหมดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี Kanamycin 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงทำการทดสอบการตายของปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์โดยปรับความเข้มข้นของ Kanamycin เป็น 0 5 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาการตายเนื่องจากความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ Kanamycin

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

การเก็บข้อมูลประกอบด้วย

1. จำนวนกาบใบที่ตายในแต่ละระดับความเข้มข้นของ Kanamycin โดยทำการเก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์
2. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Kanamycin กับอัตราการตายของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อ และการเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรีย ร่วมกับชิ้นส่วนพืช

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD แบ่งเป็น 3 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 วิธีการปลูกเชื้อมี 2 ระดับ คือ หยคอะโกรแบคทีเรียบนชิ้นส่วนพืช (กาบใบและช่อดอกอ่อน) และจุ่มชิ้นส่วนในสารละลายอะโกรแบคทีเรีย

ปัจจัยที่ 2 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษามี 3 ระดับคือ พลาสมิด pCAMBIA 2201 pCAMBIA 1305.1 และ pCAMBIA 1305.2

ปัจจัยที่ 3 อาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย มี 2 ระดับคือ กระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลาย glucose 10 mM ร่วมกับ acetosyringone (AS) 100 μ M และ เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จำนวนกรรมวิธีที่ทำการทดลองมี 12 กรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ ใน 1 ซ้ำใช้ชิ้นส่วนจำนวน 20 ชิ้น

วิธีการดำเนินงาน

1. ขั้นตอนการเตรียมพลาสมิด การเตรียม Competent เซลล์ การสกัด DNA และการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย

1.1 การเตรียม Competent *E. coli* โดยใช้ Calcium chloride

1.1.1. จุ่มโคโลนีเดี่ยวๆของ *E. coli* ใส่ในหลอดที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มีอาหาร LB ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน(ประมาณ 15 -17 ชั่วโมง)

1.1.2. ย้ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการบ่มไว้ข้ามคืนปริมาตร 1 ml ใส่ใน flask ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มีอาหาร LB ปริมาตร 50 ml ทำการบ่มโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.2-0.5

1.1.3. ทำการเก็บเซลล์โดยเทอาหารที่มีเชื้อปริมาตร 50 ml ใส่ในหลอดที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.4. เทน้ำที่เป็นส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนเซลล์ เดิม CaCl_2 ความเข้มข้น 50 mM ที่เข้มข้นน้ำแข็งปริมาตร 4 ml ละลายเซลล์ใน CaCl_2 เมื่อเซลล์ละลายหมดแล้วเติม CaCl_2 เพิ่ม 16 ml นำเซลล์ที่ได้บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

1.1.5. เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที จากนั้นเทน้ำส่วนใสทิ้งให้หมดเหลือไว้เฉพาะตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ใน CaCl_2 ที่เย็นปริมาตร 2 ml เติม 80 % glycerol ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากันแบ่งเซลล์ 150 μl ใส่ใน eppendorf tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

1.2 ขั้นตอนการย้ายพลาสมิดเข้า *E.coli* (DH5 α)

1.2.1. ละลายพลาสมิด ด้วย Tris - HCl (pH 8.0) ปริมาตร 10 μl

1.2.2. ใส่พลาสมิด ปริมาตร 2 μl ใน eppendorf tube ที่มี competent เซลล์ ปริมาตร 150 μl

1.2.3. Spin down แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

1.2.4. ย้ายลงใน Water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาทีทันที

1.2.5. เติมน้ำอาหาร LB 800 μl จากนั้นวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที

1.2.6. spread เซลล์ บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ Kanamycin 50 mg/l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

1.2.7. สังเกตการเกิดโคโลนีบนอาหาร

1.3. ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดโดยวิธี CTAB

1.3.1. เติมหอาหารที่มีเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนจากโคโลนีเดี่ยว ๆ ลงใน eppendorf tube ปริมาตร 1.5 ml

1.3.2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกให้หมดเหลือตะกอนเซลล์ไว้ (อาจเติมหอาหารที่มีเชื้ออีก 1.5 ml เพื่อเพิ่มปริมาณ เซลล์)

1.3.3. ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย 0.4 ml ของสารละลาย STET (8% sucrose w/v, 0.1% v/v Triton X-100, 50 mM EDTA, 50mM Tris - HCl pH 8.0)

1.3.4. เมื่อตะกอนเซลล์ละลายหมดแล้วเติม 50 mg/ml lysozyme ปริมาตร 30 μ l (lysozyme เก็บไว้ในที่เย็นจนกระทั่งใช้งาน)

1.3.5. ทำการขยับกรอกจนกระทั่งสารละลายเข้ากันได้ดีบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากเติม lysozyme

1.3.6. วางตัวอย่างบน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที

1.3.7. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีทันที ช้าย supernatant ใส่หลอดใหม่

1.3.8. เติมสารละลาย CTAB (5% w/v) ปริมาตร 30 μ l ใส่สารละลายตัวอย่าง แล้วทำการขยับกรอกจะเกิดเป็นตะกอนสีขาวขึ้นทันที และจะพบสารแขวนลอยในสารตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที โดยไม่มีการเขย่าเพิ่มเพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ที่มากพอ

1.3.9. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

1.3.10. ช้ายส่วนที่เป็นของเหลวออกอย่าให้ตัวอย่างแห้ง

1.3.11. ละลายตัวอย่างด้วย 1.2 M NaCl ปริมาตร 300 μ l ในขั้นตอนนี้ต้องการกำจัด RNA ออก ต้องเติม Rnase ปริมาตร 2 μ l (Rnase 10 mg/l) ทำการ spin down บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่า DNA ละลายหมด จากนั้นกำจัด Rnase/โปรตีนออกด้วยการเติม chloroform 300 μ l (ใช้ 1 ปริมาตร ของสารละลายที่มี) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จะเกิดการแยกชั้นของสารละลายขึ้นโดยส่วนที่อยู่บนสุด สารละลายจะมีสีใส คือส่วนที่มี DNA ละลายอยู่ส่วนที่อยู่ตรงกลางคือ โปรตีนมีลักษณะเป็นเส้นไขสีขาวและส่วนที่อยู่ล่างสุดคือ chloroform ซึ่งจะหนักกว่าน้ำ คูณสารละลายส่วนใสที่อยู่ข้างบน (ปริมาตร 300 μ l คือส่วนของ NaCl ที่เติม) ใส่ใน eppendorf tube ใหม่ (เพิ่มเติม : เติม 3 M Na

acetate เพื่อให้ DNA ตกตะกอนได้ดีขึ้น โดยเติม 1 ใน 10 ของปริมาตร ที่มี DNA ละลายอยู่ (300 μ l * 1/10 = 30 μ l)

1.3.12. เติม absolute ethanol 660 μ l (2 เท่าของปริมาตรที่มี $2 \times 330 = 660$ μ l)

เพื่อให้ DNA ตกตะกอน

1.3.13. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

1.3.14. เอาส่วนที่เป็นของเหลวใสออกเติม 70 % ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 1,000 μ l จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง)

1.3.15. Spin down เพื่อล้างตะกอน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เพื่อเอา ethanol ออก

1.3.16. ตากเซลล์ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ ethanol ระเหยออกให้หมด

1.3.17. ละลาย DNA ด้วย 10 mM Tris - HCl pH 8.0 ปริมาตร 15 μ l spin down เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

1.4. การเตรียม competent *Agrobacterium tumefaciens* โดยใช้ Calcium chloride

1.4.1. จิมโคโลนีเดี่ยวๆ ของ *Agrobacterium tumefaciens* ใส่ในหลอดที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มีอาหาร LB ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

1.4.2. ย้ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการบ่มไว้ข้ามคืนปริมาตร 1 ml ใส่ใน flask ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มีอาหาร LB ปริมาตร 50 ml ทำการบ่มโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่า O.D. 600 อยู่ในช่วง 0.2-0.5

1.4.3. ทำการเก็บเซลล์โดยเทอาหารที่มีเชื้อปริมาตร 50 ml ใส่ในหลอดที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4.4. เทน้ำที่เป็นส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนเซลล์ เติม CaCl_2 ความเข้มข้น 50 mM ที่แช่เย็นปริมาตร 4 ml ละลายเซลล์ใน CaCl_2 เมื่อเซลล์ละลายหมดแล้วเติม CaCl_2 เพิ่ม 16 ml นำเซลล์ที่ได้บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

1.4.5. เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทน้ำส่วนใสทิ้งให้หมดเหลือไว้เฉพาะตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ใน CaCl_2 ที่เย็นปริมาตร 2 ml เติม 80 % glycerol ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน แบ่งเซลล์ใส่ใน eppendorf tube 150 μ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

1.5. ขั้นตอนการย้ายพลาสมิดเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

1.5.1. วาง eppendorf tube ที่มี competent เซลล์ ของ *Agrobacterium tumefaciens* ปริมาตร 150 μ l บนน้ำแข็ง

1.5.2. ใส่พลาสมิดปริมาตร 1 μ l (ประมาณ 300 ng/ μ l) ลงใน competent เซลล์ ผสมให้เข้ากัน

1.5.3. บ่มเซลล์บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการ freeze เซลล์ใน ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 นาที 15 วินาที

1.5.4. ละลาย เซลล์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 – 6 นาที

1.5.5. เติมน้ำอาหาร LB ปริมาตร 850 μ l ลงในหลอด

1.5.6. บ่ม เซลล์ ไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 – 4 ชั่วโมง

1.5.7. เติมน้ำอาหาร LB ที่เติม Kanamycin 50 mg/l

1.5.8. บ่มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 วัน

2. ขั้นตอนการถ่ายยีนและการทดสอบการแสดงออกของยีน

2.1. การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการเพาะเลี้ยงก่อนทำการถ่ายยีน

ใช้ชิ้นส่วนกาบใบจากตาของปทุมมาที่ทำการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 10 วัน นำกาบใบ (leaf sheath) มาล้างตามยาวโดยกาบใบที่ได้จะต้องมีส่วนที่เป็นรอยต่อของบริเวณ ส่วนฐานติดมาด้วย และตัดให้มีความยาวจากฐานใบประมาณ 0.3 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงกาบใบบนอาหารสูตร MS 2 สูตร คืออาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

ใช้ช่อดอกอ่อน ตัดชิ้นส่วนดอกอ่อนตามขวางออกจากบริเวณส่วนฐานช่อดอกอ่อน นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์

2.2 . การเตรียมอะโกรแบคทีเรีย

เลี้ยงอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGLO ที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 2201, pCAMBIA 1305.1 และ pCAMBIA 1305.2 ในอาหารสูตร LB ที่เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Rifampicin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเป็น 0.5 ทำความสะอาดแบคทีเรียโดยล้างในสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M

2.3. การปลูกเชื้อแบคทีเรียลงบนชิ้นส่วนพืช

นำชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงก่อนทำการถ่ายยีน จุ่มในสารละลายอะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงร่วม (co-cultivation medium) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำชิ้นส่วนไปทำการทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ต่อไป หรือหดยดสารละลายที่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ปริมาตร 5 μ l บนชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแตกต่างกัน ก่อนนำไปทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างอะโกรแบคทีเรียกับชิ้นส่วนพืช เป็นเวลา 3 วัน

2.4. การทดสอบโดยวิธี GUS assay

นำชิ้นส่วนพืชไปบ่มในสารละลาย X - Gluc ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สังเกตการเกิดน้ำเงิน (ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อได้รับยีน *gus* จะมีการแสดงออกของยีน โดยสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase ซึ่งจะเปลี่ยนสารตั้งต้น X - Gluc ให้เป็นสารสีน้ำเงินทำให้ง่ายต่อการตรวจสอบชิ้นส่วนของพืชที่ได้รับยีน หลังจากนั้นเติม 70% ethanol เพื่อขจัด chlorophyll ออกจากชิ้นส่วนพืช

การเก็บข้อมูลและบันทึกผล

การเก็บข้อมูลประกอบด้วย

1. เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนพืชซึ่งมีการแสดงออกของจุดสีน้ำเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X- Gluc โดยคำนวณจากชิ้นส่วนพืชที่มีการแสดงออกของจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายภาพทั้งหมด $\times 100$
2. จำนวนจุดสีน้ำเงินต่อชิ้นส่วนพืช

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และแปลงค่าของข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาการเกิดยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชของปทุมมาจาก 2 แหล่งคือ ชิ้นส่วนกาบใบและชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน

1.1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบ

การศึกษาทำการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอดต่อจำนวนชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยง $\times 100$) และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช เมื่อเก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์พบว่า ปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์เริ่มเกิดยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากการเพาะเลี้ยง และพบว่า ปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดในสัปดาห์ที่ 4-12 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ในสัปดาห์ที่ 14 – 18 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตาราง 2) นอกจากนี้มีจำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตาราง 3)

ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า ชิ้นส่วนของกาบใบไม่สามารถเกิดยอดใหม่ได้

ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ชิ้นส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 46.67 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 3.43 สายพันธุ์ช่อมรกต และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาคือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.23 และ 2.93 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรด และเชียงใหม่พิงค์มีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ช่อมรกต และเชียงใหม่ไวท์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 46.67 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 1.77 และ 1.43 ตามลำดับ

ในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า ชิ้นส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ และช่อมรกตมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 46.47 และ 56.67 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 4.60 และ 4.00 สายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์ และเชียงใหม่เรดมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาคือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 43.33 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์

มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 3.50 และ 2.23 ตามลำดับ สายพันธุ์เชิงใหม่จึงมีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกด เชิงใหม่ไวท์ และเชิงใหม่เรดโคยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 46.67 และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 1.80

ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า จีนส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีจำนวนยอดต่อจีนส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์ซ่อมรกด สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 60.00 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อจีนส่วนเท่ากับ 5.60 5.00 และ 5.20 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรดและเชียงใหม่ฟิงค์มีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ซ่อมรกด สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่ไวท์โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และ 56.67 มีจำนวนยอดต่อจีนส่วนเท่ากับ 3.27 และ 2.23 ตามลำดับ

ในสัปดาห์ที่ 10 พบว่า ชี้นส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีจำนวนยอดต่อช่อด้านพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกต สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 60.00 และ 53.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อช่อด้านเท่ากับ 7.30 6.93 และ 6.13 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรด และเชียงใหม่พิกซ์มีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ช่อมรกต สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่ไวท์โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และ 56.67 มีจำนวนยอดต่อช่อด้านเท่ากับ 4.23 และ 3.13 ตามลำดับ

ในสัปดาห์ที่ 12 พบว่า จีนส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีจำนวนยอดต่อจีนส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกด เชียงใหม่ไวท์ และสโนว์ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 53.33 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อจีนส่วนเท่ากับ 7.97 7.17 และ 7.10 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรดมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาก็คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนยอดต่อจีนส่วนเท่ากับ 5.43 สายพันธุ์เชียงใหม่พิกัดมีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ช่อมรกด เชียงใหม่ไวท์ สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่เรดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และมีจำนวนยอดต่อจีนส่วนเท่ากับ 3.87

ในสัปดาห์ที่ 14 พบว่า จีนส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดขอดและมีจำนวนขอดต่อจีนส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์ซ่อมรกด เชียงใหม่ไวท์ และสโนว์ไวท์มีความสามารถในการเกิดขอดใหม่ดีที่สุด

คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 83.33 70.00 และ 73.33 เปอร์เซนต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 8.77 8.53 และ 7.97 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาก็คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 63.33 เปอร์เซนต์มีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 6.30 สายพันธุ์เชียงใหม่จึงมีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ช่อมรกต เชียงใหม่ไวท์ สโนว์ไวท์และเชียงใหม่เรดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 และมีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 4.27

ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่า ขึ้นส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและมีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยังปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกต และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 83.33 และ 70.00 เปอร์เซนต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 9.60 และ 9.60 ตามลำดับ สายพันธุ์สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่เรดมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาก็คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 73.33 และ 63.33 เปอร์เซนต์มีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 8.60 และ 7.10 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่จึงมีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ช่อมรกต เชียงใหม่ไวท์ สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่เรดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 และมีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 4.67

ในสัปดาห์ที่ 18 พบว่า ขึ้นส่วนของกาบใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและมีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยังปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกต และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 83.33 และ 70.00 เปอร์เซนต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 9.90 และ 9.83 ตามลำดับ สายพันธุ์สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่เรดมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาก็คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 73.33 และ 63.33 เปอร์เซนต์มีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 8.93 และ 7.57 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่จึงมีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ช่อมรกต เชียงใหม่ไวท์ สโนว์ไวท์ และเชียงใหม่เรดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เท่ากับ 70.00 และมีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนเท่ากับ 4.80

จากการศึกษาทั้ง 18 สัปดาห์จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของปทุมมาทุกสายพันธุ์เพิ่มขึ้นและจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนพืชมีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยสัปดาห์ที่ 16 และ 18 มีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนพืชไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องจากในสัปดาห์แรกๆ ของการเก็บข้อมูลที่ได้พัฒนาขึ้นมาขนาดเล็กจึงทำให้จำนวนยอดใหม่น้อยโดยสัปดาห์ที่ 16 ได้พัฒนาเป็นยอดใหม่เกือบหมดแล้วทำให้จำนวนยอดในสัปดาห์ที่ 16 และ 18 ไม่แตกต่างกันและเมื่อพิจารณาจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนพืชพบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 สายพันธุ์สโนว์ไวท์มีจำนวนยอดต่อขึ้นส่วนสูง

สูงสุด ทั้งนี้อาจเกิดจากการเกิดตายของสายพันธุ์ซ่อมรกดและเชิงใหม่ไวท์ช้ากว่าสายพันธุ์ สโนว์ไวท์หรือการพัฒนาของตายออกไปเป็นยอดของสายพันธุ์ซ่อมรกดและเชิงใหม่ไวท์ช้ากว่า พันธุ์สโนว์ไวท์ทำให้ในสัปดาห์แรกๆ มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชต่ำกว่า ในขณะที่สัปดาห์หลังๆ กลับมีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนสูงกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนระหว่าง สัปดาห์ในปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์พบว่า ในสัปดาห์ที่ 16 และ 18 มีจำนวนต้นต่อชิ้นส่วนมากที่สุด (ตาราง 4)

1.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน

การศึกษาจะทำการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด ต่อจำนวนชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยง $\times 100$) และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช จากการศึกษาพบว่า เมื่อเก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์ ปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์ จะเริ่มเกิดยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากการ เพาะเลี้ยง จากการศึกษา พบว่า ปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 6 - 8 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จะพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 10- 14 หลังการทดลอง และพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในสัปดาห์ที่ 16- 20 หลัง การทดลอง (ตาราง 5) นอกจากนี้จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ ในสัปดาห์ที่ 6 -14 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญใน สัปดาห์ที่ 16- 18 หลังการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 20 หลังการทดลองพบความแตกต่างทางสถิติอย่าง มีนัยสำคัญยิ่ง (ตาราง 6)

ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนไม่สามารถเกิดยอดใหม่ได้

ในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปทุมมาสาย พันธุ์ซ่อมรกด สโนว์ไวท์ เชิงใหม่ไวท์ เชิงใหม่เรด และเชิงใหม่ฟิงคัมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด เท่ากับ 40.00 46.67 33.33 26.67 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 0.83 0.67 0.60 0.60 และ 0.40

ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปทุมมาสาย พันธุ์ซ่อมรกด สโนว์ไวท์ เชิงใหม่ไวท์ เชิงใหม่เรด และเชิงใหม่ฟิงคัมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด เท่ากับ 40.00 46.67 33.33 26.67 และ 26.67 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 1.27 1.07 1.23 0.97 และ 1.03

ในสัปดาห์ที่ 10 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมีความ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความ แตกต่างกันทางสถิติ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกด และเชิงใหม่ไวท์มีความสามารถ

ในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุดคือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 60.00 53.33 และ 40.00 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 1.70 1.80 และ 1.70 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรด และเชียงใหม่พิกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกด และเชียงใหม่ไวท์โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 33.33 และ 30.00 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 1.67 และ 1.37

ในสัปดาห์ที่ 12 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกก่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกด และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุดคือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 60.00 53.33 และ 40.00 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.40 2.27 และ 2.17 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรด และเชียงใหม่พิกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกดและเชียงใหม่ไวท์โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 33.33 และ 30.00 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.03 และ 1.90

ในสัปดาห์ที่ 14 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกก่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกด และเชียงใหม่ไวท์มีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุดคือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 60.00 53.33 และ 40.00 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.80 2.77 และ 2.73 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่เรด และเชียงใหม่พิกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกดและเชียงใหม่ไวท์โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 33.33 และ 30.00 เปอร์เซนต์ และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.60 และ 2.33

ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่า ชิ้นส่วนของช่อดอกก่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ และซ่อมรกดมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ดีที่สุดคือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 และ 66.67 เปอร์เซนต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 3.63 และ 3.40 สายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่เรดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาคือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และ 40.00 เปอร์เซนต์มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 3.27 และ 3.17 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่พิกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ซ่อมรกด เชียงใหม่ไวท์ และเชียงใหม่เรดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 40.00 เปอร์เซนต์และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.77

ในสัปดาห์ที่ 18 พบว่า ชี้นส่วนของช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ และช่อมรกคมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่คี่ที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 4.23 และ 3.97 สายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่เรดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาก็คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 3.50 และ 3.53 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่พิกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ช่อมรกค เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่เรดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.90

ในสัปดาห์ที่ 20 พบว่า ชี้นส่วนของช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ และช่อมรกคมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่คี่ที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 70.00 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 5.33 และ 4.30 ปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่เรดมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่รองลงมาก็คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 56.67 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 3.80 และ 3.70 ตามลำดับ สายพันธุ์เชียงใหม่พิกมีความสามารถในการเกิดยอดต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์สโนว์ไวท์ ช่อมรกค เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่เรด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนเท่ากับ 2.90

จากการศึกษาทั้ง 20 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของปทุมมาทุกสายพันธุ์เพิ่มขึ้นและจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชมีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยจะพบความแตกต่างของจำนวนยอดใหม่ที่เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 18 และจะเพิ่มมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 20 ซึ่งอาจเนื่องจากในสัปดาห์แรกๆ ของการเก็บข้อมูลค่าที่ได้พัฒนาขึ้นมามีขนาดเล็กและจะเริ่มเกิดยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากการเพาะเลี้ยง โดยสัปดาห์ที่ 18 ค่าได้พัฒนาเป็นยอดใหม่เกือบหมดแล้วและพัฒนาเป็นยอดใหม่หมดในสัปดาห์ที่ 20 ทำให้มีจำนวนยอดมากที่สุด และเมื่อพิจารณาจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชพบว่า ในสัปดาห์ที่ 6 – 14 ปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจเกิดจากการเกิดตาของช่อดอกของปทุมมาหรือการพัฒนาไปเป็นยอดใกล้เคียงกัน และในสัปดาห์หลังๆ พบว่า สายพันธุ์สโนว์ไวท์มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงที่สุดในขณะที่สายพันธุ์อื่นมีการพัฒนาเป็นยอดเพิ่มมากขึ้น เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนทุก 2 สัปดาห์ในปทุมมาทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 18 และ 20 มีจำนวนต้นต่อชิ้นส่วนมากที่สุด (ตาราง 7)

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 - 18 สัปดาห์

สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบหลังจากทำการทดลอง (สัปดาห์)							
	4	6	8	10	12	14	16	18
สโนว์ไวท์	46.47a	46.47a	60.00a	60.00a	60.00a	73.33ab	73.33ab	73.33a
ซ่อมรกด	56.67a	56.67a	70.00a	70.00a	70.00a	83.33a	83.33a	83.33a
เชียงใหม่ไวท์	43.33a	43.33a	53.33a	53.33a	53.33a	70.00ab	70.00ab	70.00ab
เชียงใหม่เรด	46.67a	46.67a	56.67a	56.67a	56.67a	63.33b	63.33b	63.33b
เชียงใหม่พังก์	46.67a	46.67a	56.67a	56.67a	56.67a	70.00ab	70.00ab	70.00ab
Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**
C.V.								
(เปอร์เซ็นต์)	22.18	22.18	22.61	22.61	22.61	13.89	13.89	13.89

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 3 จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 - 18 สัปดาห์

สายพันธุ์	จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบหลังจากทำการทดลอง (สัปดาห์)							
	4	6	8	10	12	14	16	18
สโนว์ไวท์	3.43a	4.60a	5.00a	6.93a	7.10a	7.97a	8.60ab	8.93ab
ซ่อมรกต	2.23bc	4.00a	5.60a	7.30a	7.97a	8.77a	9.60a	9.90a
เชียงใหม่ไวท์	2.93ab	3.50ab	5.20a	6.13a	7.17a	8.53a	9.60a	9.83a
เชียงใหม่เรด	1.77c	2.23bc	3.27b	4.23b	5.43b	6.30b	7.10b	7.57b
เชียงใหม่พังก์	1.43c	1.80c	2.23b	3.13b	3.87c	4.27c	4.67c	4.80c
Sig.	**	**	**	**	**	**	**	**
C.V.								
(เปอร์เซ็นต์)	70.49	79.28	63.98	50.78	45.86	40.67	39.11	38.41

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 4 เปรียบเทียบจำนวนการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์

จำนวนการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์					
สัปดาห์ที่	สโนว์ไวท์	ซ่อมรกต	เชียงใหม่ไวท์	เชียงใหม่เรด	เชียงใหม่พังก์
4	3.43c	2.23e	2.93e	1.77f	1.43e
6	4.60c	4.00de	3.50e	2.23f	1.80de
8	5.00c	5.60cd	5.20d	3.27e	2.23d
10	6.93b	7.30bc	6.13dc	4.23d	3.13c
12	7.10b	7.97ab	7.17c	5.43c	3.87b
14	7.97ab	8.77ab	8.53b	6.30b	4.27ab
16	8.60ab	9.60ab	9.60ab	7.10a	4.67a
18	8.93a	9.90a	9.80a	7.57a	4.80a
Sig.	**	**	**	**	**
C.V.					
(เปอร์เซ็นต์)	49.93	61.47	34.52	30.79	42.7

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 6 -20 สัปดาห์

สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนหลังจากทำการทดลอง (สัปดาห์)							
	6	8	10	12	14	16	18	20
สโนว์ไวท์	46.67a	46.67a	60.00a	60.00a	60.00a	70.00a	70.00a	70.00a
ซ่อมรกด	40.00a	40.00a	53.33abc	53.33abc	53.33abc	66.67a	66.67a	66.67a
เชียงใหม่ไวท์	33.33a	33.33a	40.00abc	40.00abc	40.00abc	56.67ab	56.67ab	56.67ab
เชียงใหม่เรด	26.67a	26.67a	33.33bc	33.33bc	33.33bc	40.00b	40.00b	40.00b
เชียงใหม่พังก์	26.67a	26.67a	30.00c	30.00c	30.00c	40.00b	40.00b	40.00b
Sig.	ns	ns	*	*	*	**	**	**
C.V.								
(เปอร์เซ็นต์)	32.47	32.47	24.57	24.57	24.57	17.67	17.67	17.67

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 6 จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลอง เป็นระยะเวลา 6 - 20 สัปดาห์

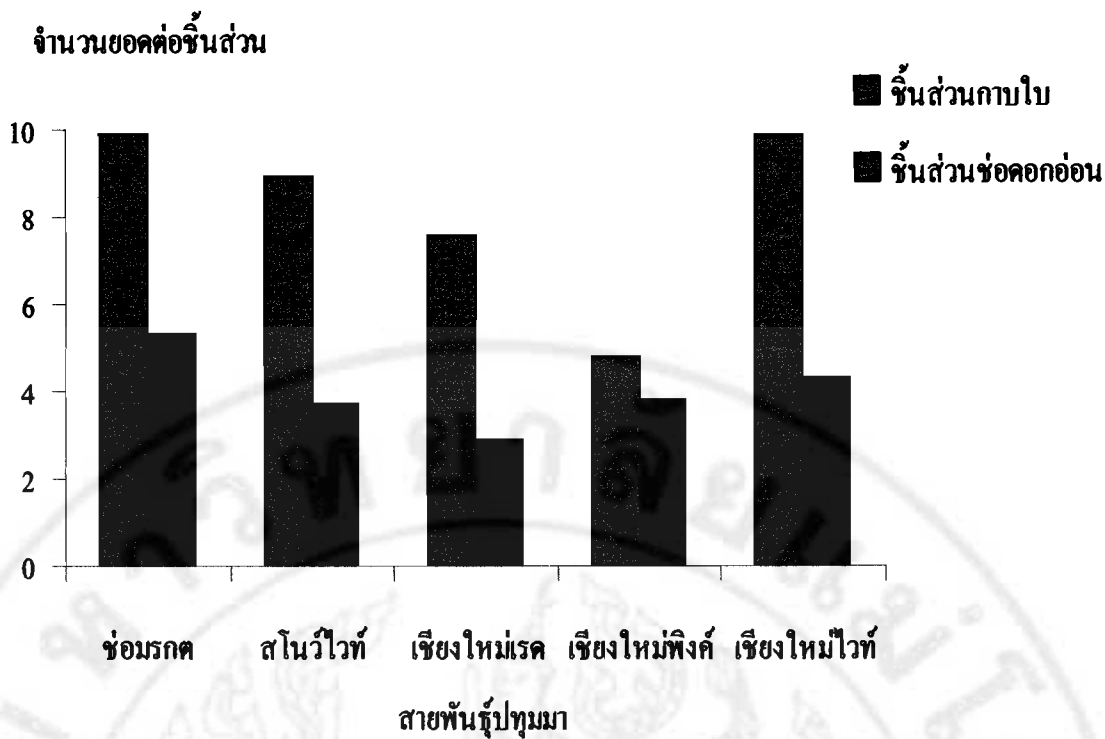
สายพันธุ์	จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนหลังจากทำการทดลอง (สัปดาห์)							
	6	8	10	12	14	16	18	20
สโนว์ไวท์	0.67a	1.07a	1.70a	2.40a	2.80a	3.63a	4.23a	5.33a
ซ่อมรกด	0.83a	1.27a	1.80a	2.27a	2.77a	3.40ab	3.97a	4.30b
เชียงใหม่ไวท์	0.60a	1.23a	1.87a	2.17a	2.73a	3.27ab	3.50ab	3.80b
เชียงใหม่เรด	0.60a	0.97a	1.67a	2.03a	2.60a	3.17ab	3.53ab	3.70b
เชียงใหม่พังก์	0.40a	1.03a	1.37a	1.90a	2.33a	2.77b	2.90b	2.90c
Sig.	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	**
C.V.								
(เปอร์เซ็นต์)	112.41	66.31	48.48	41.70	36.85	36.13	36.64	37.35

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 7 เปรียบเทียบจำนวนการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ ทุก 2 สัปดาห์

จำนวนการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์					
สัปดาห์ที่	สโนว์ไวท์	ซ่อมรกต	เชียงใหม่ไวท์	เชียงใหม่เรด	เชียงใหม่พังก์
4	3.43c	2.23e	2.93e	1.77f	1.43e
6	4.60c	4.00de	3.50e	2.23f	1.80de
8	5.00c	5.60cd	5.20d	3.27e	2.23d
10	6.93b	7.30bc	6.13dc	4.23d	3.13c
12	7.10b	7.97ab	7.17c	5.43c	3.87b
14	7.97ab	8.77ab	8.53b	6.30b	4.27ab
16	8.60ab	9.60ab	9.60ab	7.10a	4.67a
18	8.93a	9.90a	9.80a	7.57a	4.80a
Sig.	**	**	**	**	**
C.V.					
(เปอร์เซ็นต์)	49.93	61.47	34.52	30.79	42.7

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบ โดย DMRT



ภาพ 6 การเกิดต้นใหม่ต่อชิ้นส่วนกาบใบและช็อคก้อ่อน



ภาพ 7 การเกิดยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบและชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา

A และ B การเกิดยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบ

C และ D การเกิดยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อน

การทดลองที่ 2 การศึกษาจุดกำเนิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อน

การศึกษาคำแหน่งการเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนกาบใบ โดยทำการตัดชิ้นส่วนกาบใบตามขวางและตัดตามยาวและย้อมด้วยสี Mayer' hematoxylin พบว่า ชิ้นส่วนของกาบใบเริ่มปรากฏจุดกำเนิดยอด (shoot primodia) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยพบจุดกำเนิดยอดใหม่เกิดเป็นแนวเดียวกันตามแนวแผลที่เกิดจากการฉีกกาบใบออกจากฐานของตา (ภาพ 8C) จะเห็นจุดกำเนิดยอดเรียงตัวตลอดแนวความกว้างของกาบใบ และเมื่อทำการตัดตามยาวของชิ้นส่วนกาบใบจะเห็นได้ว่า จุดกำเนิดยอดใหม่จะเกิดบริเวณขอบรอยแผลส่วนฐานที่เกิดจากการฉีกกาบใบออกจากฐาน และพบว่า บริเวณอื่นๆของกาบใบไม่มีจุดกำเนิดยอดใหม่ (ภาพ 8E) ในส่วนของช่อดอกอ่อนจะเริ่มปรากฏจุดกำเนิดยอดหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน และเมื่อศึกษาถึงจุดกำเนิดยอดพบว่า จุดกำเนิดยอดจะเกิดบริเวณซอกกลีบของดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงและห่างจากโคนของช่อดอกอ่อนที่เกิดจากการฉีกออกจากบริเวณรอยต่อระหว่างฐานของช่อดอกอ่อน (ภาพ 8D) ซึ่งจะเห็นได้ว่าจุดกำเนิดตาดอกจะเกิดบริเวณภายในดอกบริเวณส่วนฐานช่อดอกอ่อนซึ่งห่างจากรอยขาดแผลที่เกิดจากการแยกดอกย่อยออกจากช่อดอก และเมื่อทำการตัดตามยาวของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนจะเห็นได้ว่าจุดกำเนิดยอดใหม่จะเกิดบริเวณใกล้กับใจกลางของดอกเดิมและพบว่า บริเวณอื่นๆ ของช่อดอกอ่อนไม่มีจุดกำเนิดยอดใหม่ (ภาพ 8F)



ภาพ 8 การเกิดจุดกำเนิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบที่ได้จากตาและช่อดอกอ่อนของปทุมมา

A การเกิดต้นจากชิ้นส่วนกาบใบที่ได้จากตา

B การเกิดต้นจากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน

C ภาพตัดตามขวางของชิ้นส่วนกาบใบที่ได้จากตา หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน; บริเวณถูกตรึงคือ จุดกำเนิดยอดใหม่

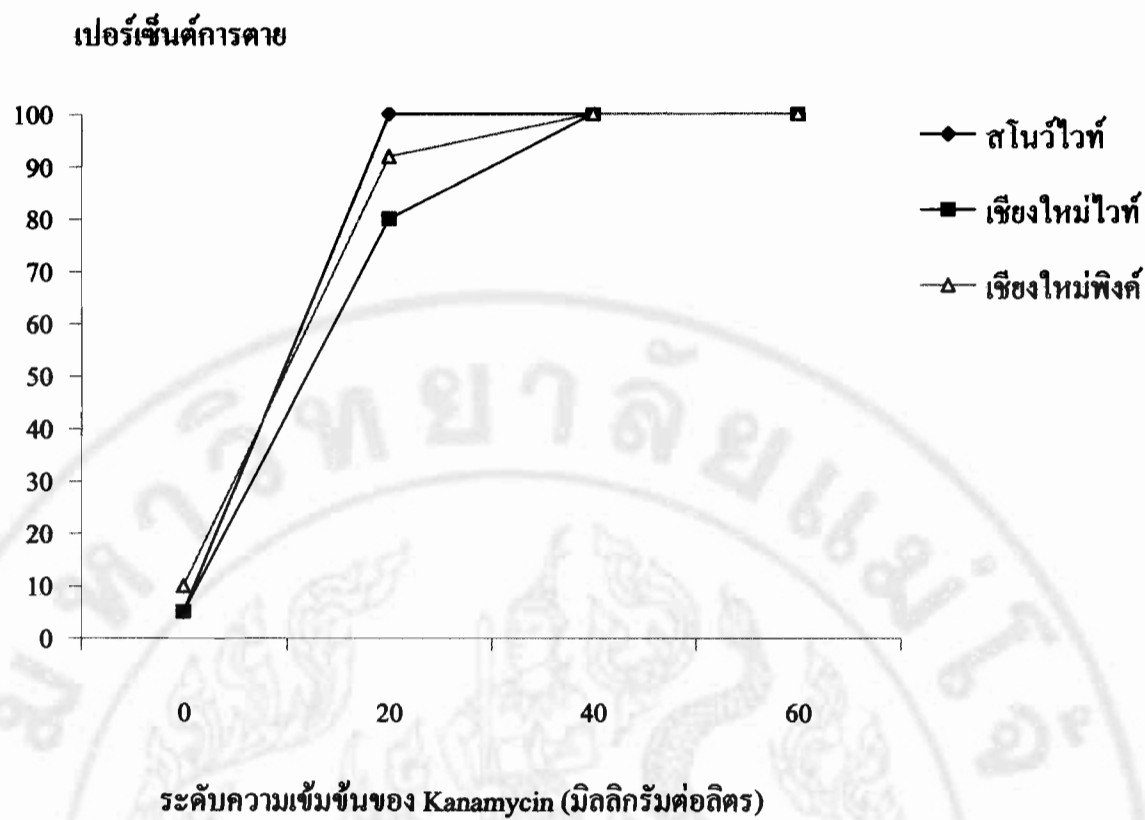
D ภาพตัดตามขวางของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน; บริเวณถูกตรึงคือ จุดกำเนิดยอดใหม่

E ภาพติดตามยาวของชิ้นส่วนกาบใบที่ได้จากตา หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน;
บริเวณลูกศรชี้คือ จุดกำเนิดยอดใหม่

F ภาพติดตามยาวของชิ้นส่วนข้อดอกอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน

การทดลองที่ 3 การศึกษาการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ Kanamycin ของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ Kanamycin แตกต่างกัน คือ 0 20 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาในแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์สโนว์ไวท์ เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่พิงค์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายเนื่องจากการได้รับสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ภาพ 9) โดยลักษณะการตายของชิ้นส่วนกาบใบจะเริ่มจากกาบใบมีสีเขียวซีด ใบด่างและซีดลงเรื่อยๆ จนเห็นเป็นสีขาวและกลายเป็นสีน้ำตาลในที่สุด (ภาพ 10) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของระดับสารปฏิชีวนะ Kanamycin ต่อเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนพบว่าปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์จะตายทั้งหมดคือมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นของ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร Kanamycin หลังจากการทดลองเป็นเวลา 30 วัน ในขณะที่ปทุมมาสายพันธุ์ เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่พิงค์จะตายทั้งหมดที่ความเข้มข้นของ Kanamycin 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการทดลองเป็นเวลา 30 วัน ดังนั้นถ้าต้องการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin ในสายพันธุ์สโนว์ไวท์จะต้องเลือกที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร Kanamycin เพื่อประหยัคสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ใช้ในการคัดเลือกและในสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่พิงค์จะต้องทำการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร Kanamycin



ภาพ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ Kanamycin ต่ออัตราการตายของชิ้นส่วนกาบใบปทุมมา 3 สายพันธุ์



ภาพ 10 การตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ Kanamycin ของชิ้นส่วนถาโบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในปทุมมา

- A ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Kanamycin 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- B ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Kanamycin 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
- C ปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Kanamycin 20 มิลลิกรัมต่อลิตร
- D ปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Kanamycin 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 4 การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อ และการเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับชิ้นส่วนพืช

4.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบ

จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร วิธีการ(Treatment) ต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยวิธีการปลูกเชื้อ (A) ชนิดของพลาสมิด (B) วิธีการเพาะเลี้ยงร่วม (C) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและพบปฏิกริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของพลาสมิด (AxB) วิธีการปลูกเชื้อกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วม (AxC) ชนิดของพลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วม (BxC) และพบวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของ พลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยง (AxBxC) (ตารางผนวก 44)

วิธีการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนกาบใบในอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบมากที่สุดเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกับวิธีการอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 9) และไม่พบเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ก่อนทำการวิธีการปลูกเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม (ตาราง 8)

4.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน

จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วิธีการ(treatment) ต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยวิธีการปลูกเชื้อ (A) ชนิดของพลาสมิด (B) วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน(C) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบปฏิกริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของพลาสมิด (AxB) วิธีการปลูกเชื้อกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (AxC) ชนิดของพลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (BxC) และพบปฏิกริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของพลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (AxBxC) (ตารางผนวก 45)

วิธีการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนในอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำ

เงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกับวิธีการอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและพบเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่ทำการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนในอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 2201 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนเท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 10)

4.3. จำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบ

จากการทดลองพบว่า จำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร วิธีการ(treatment) ต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธีการปลูกเชื้อ (A) ชนิดของพลาสมิด (B) วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (C) มีผลทำให้จำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบปฏิกริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของพลาสมิด(AxB) วิธีการปลูกเชื้อกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน(AxC) ชนิดของพลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (BxC) และพบปฏิกริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของ พลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (AxBxC) (ตารางผนวก 47)

วิธีการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนกาบใบในอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบมากที่สุดเท่ากับ 8.00 จุดต่อชิ้นส่วนซึ่งมีความแตกต่างกับวิธีการอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 12) และไม่พบจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ก่อนทำการวิธีการปลูกเชื้อ และการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (ตาราง 11)

เมื่อพิจารณาถึงตำแหน่งที่เกิดจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนพืชพบว่า ชิ้นส่วนของกาบใบนั้นจุดสีน้ำเงินจะปรากฏอยู่บริเวณรอยแผลจากการฉีกกาบใบออกจากฐาน ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นบริเวณเดียวกับที่พบจุดกำเนิดยอด สำหรับช่อดอกอ่อนจะพบจุดสีน้ำเงินบริเวณปลายกลีบดอกและบริเวณบาดแผลจากการแยกดอกย่อยออกจากช่อดอก เมื่อพิจารณาแล้วจะพบว่า เกิดคนละบริเวณกับจุดกำเนิดยอด

4.4 จำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน

จากการทดลองพบว่า จำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วิธีการ(Treatment) ต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธีการปลูกเชื้อ (A) ชนิดของพลาสมิด (B) วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน(C) มีผลทำให้จำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบปฏิกิริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของพลาสมิด(AxB) วิธีการปลูกเชื้อกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (AxC) ชนิดของพลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน(BxC) และพบปฏิกิริยาร่วมระหว่างวิธีการปลูกเชื้อกับชนิดของพลาสมิดกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (AxBxC) (ตารางผนวก 48)

วิธีการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนในอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วยสารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 13.33 จุดต่อชิ้นส่วนซึ่งมีความแตกต่างกับวิธีการอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การจุ่มชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนในอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 2201 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนเท่ากับ 5.00 จุดต่อชิ้นส่วน (ตาราง 13)

ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X - Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

พลาสมิด	วิธีการปลูกเชื้อ	วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co – cultivation)		ค่าเฉลี่ย
		วางบนกระดาษกรอง	วางบนกระดาษกรองที่มีอาหาร	
	หยคบน ชิ้นส่วนพืช			
pCAMBIA2201		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.2		0.00	0.00	0.00
	จุ่มใน สารละลาย			
pCAMBIA2201		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.2		0.00	0.00	0.00
ค่าเฉลี่ย		0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาลเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

พลาสมิด	วิธีการปลูกเชื้อ	วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co - cultivation)		ค่าเฉลี่ย
		วางบนกระดาษกรอง	วางบนกระดาษกรองที่มีอาหาร	
	หยดบนชิ้นส่วนพืช			
pCAMBIA2201		0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.2		0.00b	0.00b	0.00
	จุ่มในสารละลาย			
pCAMBIA2201		0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.2		33.33a	0.00b	16.67
ค่าเฉลี่ย		5.55	0.00	2.78

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 10 เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วน
ข้อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1
มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

พลาสมิด	วิธีการ ปลูกเชื้อ	วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co - cultivation)		ค่าเฉลี่ย
		วางบนกระดาษกรอง	วางบนกระดาษกรองที่มีอาหาร	
	หยดบน ชิ้นส่วนพืช			
pCAMBIA2201		0.00c	0.00c	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00c	0.00c	0.00
pCAMBIA1305.2		0.00c	0.00c	0.00
	จุ่มใน สารละลาย			
pCAMBIA2201		16.67b	0.00c	8.34
pCAMBIA1305.1		0.00c	0.00c	0.00
pCAMBIA1305.2		40.00a	0.00c	20.00
ค่าเฉลี่ย		9.45	0.00	4.73

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ
ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 11 จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

พลาสมิด	วิธีการปลูกเชื้อ	วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co - cultivation)		ค่าเฉลี่ย
		วางบนกระดาษกรอง	วางบนกระดาษกรองที่มีอาหาร	
	หยดบนชิ้นส่วนพืช			
pCAMBIA2201		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.2		0.00	0.00	0.00
	จุ่มในสารละลาย			
pCAMBIA2201		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.1		0.00	0.00	0.00
pCAMBIA1305.2		0.00	0.00	0.00
ค่าเฉลี่ย		0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวนองี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบ โดย DMRT

ตาราง 12 จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

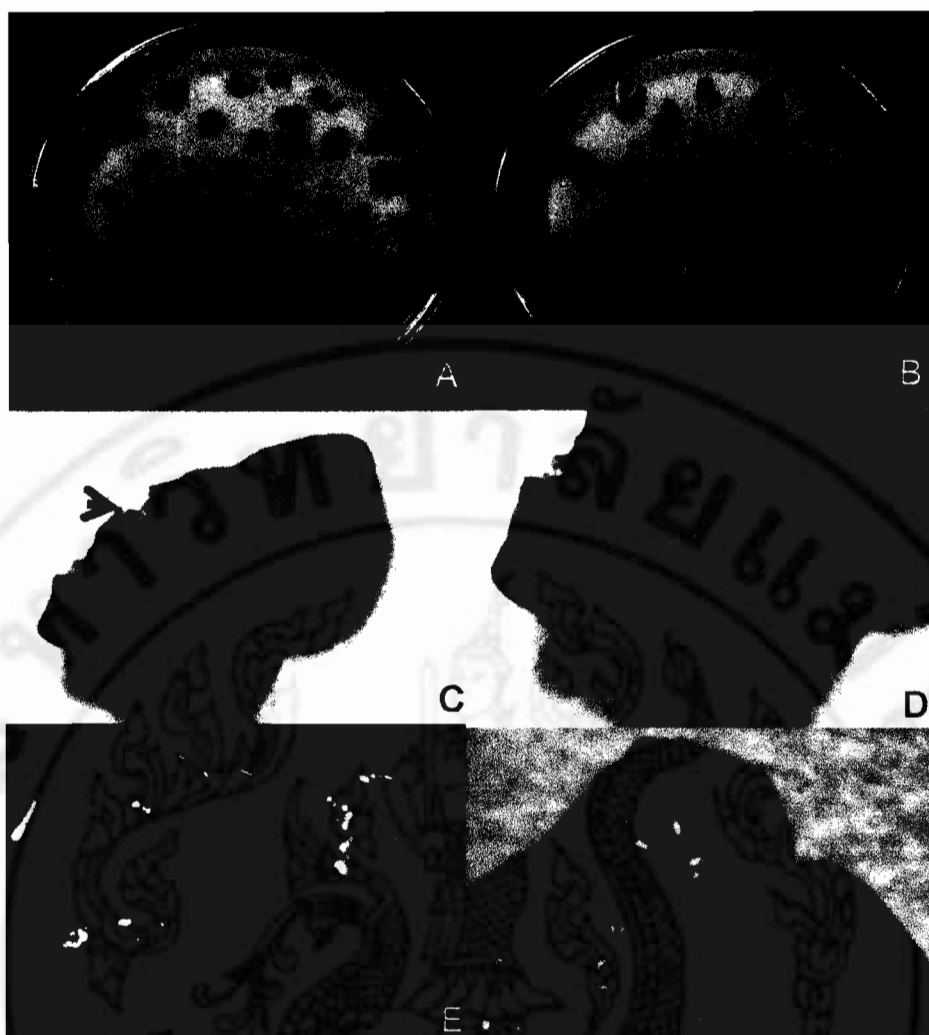
วิธีการปลูกเชื้อ	วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co - cultivation)		ค่าเฉลี่ย
	วางบนกระดาษกรอง	วางบนกระดาษกรองที่มีอาหาร	
พลาสมิด			
หอยคบน			
ชิ้นส่วนพืช			
pCAMBIA2201	0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.1	0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.2	0.00b	0.00b	0.00
จุ่มใน			
สารละลาย			
pCAMBIA2201	0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.1	0.00b	0.00b	0.00
pCAMBIA1305.2	8.00a	0.00b	4.00
ค่าเฉลี่ย	1.33	0.00	0.67

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบโดย DMRT

ตาราง 13 จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนข้อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

วิธีการปลูกเชื้อ	วิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co - cultivation)		ค่าเฉลี่ย
	วางบนกระดาษกรอง	วางบนกระดาษกรองที่มีอาหาร	
พลาสมิด			
หอยคบน			
ชิ้นส่วนพืช			
pCAMBIA2201	0.00c	0.00c	0.00
pCAMBIA1305.1	0.00c	0.00c	0.00
pCAMBIA1305.2	0.00c	0.00c	0.00
จุ่มใน			
สารละลาย			
pCAMBIA2201	5.00b	0.00c	2.5
pCAMBIA1305.1	0.00c	0.00c	0.00
pCAMBIA1305.2	13.33a	0.00c	6.67
ค่าเฉลี่ย	3.06	0.00	1.53

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังนี้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบ โดย DMRT



ภาพ 11 ชิ้นส่วนของปทุมมาที่นำมาถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน *gus* ที่ถ่ายสู่ปทุมมา

A ชิ้นส่วนกาบใบที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

B ชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่ใช้ในการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

C, D การแสดงออกของยีน *gus* จากชิ้นส่วนกาบใบ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-cultivation) เป็นเวลา 3 วัน

E, F การแสดงออกของยีน *gus* จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน หลังจากทำการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-cultivation) เป็นเวลา 3 วัน

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนในปทุมมา โดยใช้ชิ้นส่วนกาบใบและชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน เพื่อหาวิธีการเพาะเลี้ยงและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่และการถ่ายยีนนั้นพบว่า ชิ้นส่วนกาบใบมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ได้สูงสุดคือ 83.33 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนของกาบใบที่สูง โดยให้จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนพืช 9.90 ยอดต่อชิ้นส่วนของกาบใบซึ่งมากกว่าช่อดอกอ่อน สำหรับช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดใหม่ 5.33 ยอดต่อชิ้นส่วนของช่อดอก เมื่อพิจารณาถึงจุดกำเนิดยอดและบริเวณที่เกิดยอดใหม่จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนของกาบใบนั้น ในส่วนของคาพิเศษจะมีจุดกำเนิดบริเวณรอยแผลที่เกิดจากการดึงกาบใบออกจากฐาน จุดกำเนิดยอดจะไม่ห่างจากรอยแผลมากนัก และไม่พบจุดกำเนิดยอดบริเวณอื่นที่ห่างจากรอยแผลเลย โดยจุดกำเนิดยอดจะปรากฏบนชิ้นส่วนกาบใบที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 15 วัน ส่วนการศึกษาการเกิดยอดใหม่ของช่อดอกพบว่า บริเวณที่เกิดยอดใหม่จะมีจุดกำเนิดภายในช่อดอกที่ห่างจากบาดแผลมากกว่าในส่วนของกาบใบและจะพบจุดกำเนิดยอดปรากฏบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 20 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนของกาบใบมีความสามารถในการเกิดยอดใหม่ที่ดียิ่งขึ้นซึ่งเหมาะสมในการที่จะใช้เป็นชิ้นส่วนที่ใช้ในการถ่ายยีนเนื่องจากมีความสามารถในการเกิดยอดสูง และจุดกำเนิดยอดใหม่มีระยะไม่ห่างจากรอยแผลมากนักทำให้แบคทีเรียถ่ายยีนได้ไม่ยากนัก เนื่องจากการเข้าทำลายพืชของอะโกรแบคทีเรียมักจะเข้าทำลายบริเวณที่มีบาดแผล (Kingman and Kingman, 1988) ซึ่งในการถ่ายยีนนั้นแบคทีเรียจะถ่ายยีนสู่เซลล์บริเวณที่แบคทีเรียมาสัมผัสหากจุดกำเนิดยอดอยู่ห่างจากบาดแผลมากเกินไปอาจจะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถถ่ายยีนลงสู่เซลล์ที่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ เมื่อศึกษาชิ้นส่วนของกาบใบแสดงให้เห็นจุดกำเนิดยอดเกิดไม่ห่างจากบาดแผลทำให้น่าจะประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนได้ดี และเมื่อพิจารณาถึงช่อดอกพบว่าจุดกำเนิดยอดที่ห่างจากบาดแผลมากกว่ากาบใบดังนั้นโอกาสที่การถ่ายยีนจะประสบความสำเร็จจึงน้อยกว่าการใช้กาบใบ

ในการถ่ายยีนการเตรียมชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีน โดยทั่วไปแล้วชิ้นส่วนพืชที่จะใช้ในการถ่ายยีนควรมีประสิทธิภาพในการเกิดยอดใหม่ได้ดีและมีเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก จะทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนมีโอกาสพัฒนาเป็นยอดได้ง่าย นอกจากนี้ควรหาระยะที่ชิ้นส่วนของพืชเริ่มมีจุดกำเนิดยอดซึ่งในกาบใบควรทำการถ่ายยีนหลังจากทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน 15 วันและช่อดอกอ่อนควรถ่ายยีนหลังจากเพาะเลี้ยง

20 วัน เนื่องจากในการถ่ายยีนลงสู่พืชจะประสบความสำเร็จได้ดี เมื่อชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งตัวที่สูง มีการเกิดจุดกำเนิดยอดในระยะแรกๆ เพราะจะทำให้ยอดใหม่ที่ได้รับการถ่ายยีนมีเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมดไม่เกิดปัญหา chimera ขึ้น ดังในรายงานของ Aida et al. (1999) ได้ทำการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนก้านใบ cyclamen ในสภาพมืดเป็นเวลา 6 วันก่อนทำการถ่ายยีนจะทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพมากที่สุด Herath et al. (2005) พบว่า การทำให้เกิดแผลบนชิ้นส่วนและการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนปอชวาก่อนทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 วันจะทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน *gus* ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (preculture) เป็นเวลา 5 วันก่อนทำการถ่ายยีน

ในการศึกษาความเข้มข้นของ Kanamycin ที่ใช้ในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นในแต่ละพืชมีความแตกต่างกัน Boase et al. (1998) ทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นของ Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนใน *regal pelargonium* (*Pelargonium X domesticum* Dubonnet.) นอกจากนี้ Aida et al. (1999) ใช้ความเข้มข้นของ Kanamycin 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนใน *Cyclamen* (*Cyclamen persicum* Mill.) จากการศึกษาความเข้มข้นของ Kanamycin เพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนพบว่า ปทุมมาแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันโดยสายพันธุ์สโนว์ไวท์จะตายเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย 15 มิลลิกรัมต่อลิตร Kanamycin ปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่พิกซ์จะตายเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย Kanamycin 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกปทุมมาที่ได้รับการถ่ายยีนควรใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย Kanamycin ดังที่กล่าวมาข้างต้น

เมื่อทำการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนของปทุมมาด้วยวิธีการต่างๆพบว่า การใช้ชิ้นส่วนของกาบใบเป็นชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน ทำให้มีความสำเร็จในการถ่ายยีนได้ดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อน เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินและจำนวนจุดต่อชิ้นส่วนพืชสูง และเมื่อพิจารณาถึงบริเวณที่ปรากฏจุดสีน้ำเงินจะพบว่า มีบริเวณเดียวกับบริเวณที่มีจุดกำเนิดยอดใหม่ ซึ่งทำให้มีแนวโน้มว่ามีโอกาสที่จะได้ยอดที่ได้รับการถ่ายยีนที่มาก เมื่อพิจารณาถึงช่อดอกพบว่า แม้ว่าช่อดอกอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงินและจำนวนจุดต่อชิ้นส่วนพืชสูงกว่ากาบใบแต่เมื่อพิจารณาถึงบริเวณที่ปรากฏจุดสีน้ำเงินพบว่า มีบริเวณที่ห่างจากจุดกำเนิดยอด ซึ่งสามารถพบจุดสีน้ำเงินบริเวณส่วนปลายของกลีบดอกและบริเวณฐานดอกอ่อนที่ห่างจากจุดกำเนิดยอดใหม่มาก ซึ่งทำให้มีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จที่จะได้ยอดที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยช่อดอกอ่อนน้อยกว่าชิ้นส่วนกาบใบ กาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนมากกว่ากาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย

BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการถ่ายยีนนั้นจะประสบความสำเร็จได้ดีเมื่อเซลล์ของพืชมีการแบ่งตัว ซึ่ง TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม cytokinin ซึ่งมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เซลล์พืชมีการแบ่งตัว (อารีย์, 2541) และมีประสิทธิภาพสูงต่อการชักนำให้เกิดยอดที่ใช้ได้อย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด (Huetteman and Preece, 1993) จึงทำให้พืชมีความเหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการถ่ายยีน พบว่าอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิด pCambia 1305.2 มีความสามารถในการถ่ายยีนได้ดีกว่าอะโกรแบคทีเรียที่ประกอบด้วยพลาสมิดชนิดอื่นๆ ซึ่งมีรายงานเป็นจำนวนมากที่กล่าวถึงความแตกต่างของความสามารถในการถ่ายยีนเมื่อใช้พลาสมิดคนละชนิดกัน ดังรายงานของ Hoque et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pTOK233 และ pC1301-Xa21mSS สำหรับการถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์ Indica พบว่า อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pTOK233 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงกว่าพลาสมิด pC1301-Xa21mSS ในข้าวพันธุ์ Bangladeshi ที่ขาดต่อการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย

เมื่อพิจารณาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมจะพบว่า การเพาะเลี้ยงร่วมโดยใช้กระชายกรองที่หุ้มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้การถ่ายยีนประสบความสำเร็จได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงร่วมบนอาหารที่อุดมไปด้วยธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการงดธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงพืชร่วมกับแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับการถ่ายยีนของคาร์เนชั่น ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงข้อของคาร์เนชั่นร่วมกับแบคทีเรียบนกระชายกรองที่หุ้มด้วย glucose และ AS จะทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีขึ้น (Nontaswatsri et al., 2004) นอกจากนี้ Takahashi et al. (1996) ได้รายงานถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนภายใต้สภาพขาดอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยง *Eustoma* (*Eustoma grandiflorum*) ร่วมกับแบคทีเรีย ซึ่งจากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้เป็นอย่างดีว่าการงดธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงพืชร่วมกับแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้เป็นอย่างดี

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการเตรียมชิ้นส่วนปทุมมาเพื่อใช้ในการถ่ายยีนที่ได้จากชิ้นส่วน กาบใบและช่อดอกอ่อนพบว่า ชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการถ่ายยีน เนื่องจากให้จำนวนต้นต่อชิ้นส่วนพืชมากและมีจุดกำเนิดของยอดใหม่จะอยู่ใกล้กับบริเวณ ปลายของชิ้นส่วนพืช สามารถพบจุดกำเนิดของยอดใหม่หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ในขณะที่ช่อดอกให้จำนวนต้นต่อชิ้นส่วนน้อยกว่าชิ้นส่วนกาบใบและมีจุดกำเนิดของยอดใหม่เกิด บริเวณช่อกกليبของดอกที่ทำการเพาะเลี้ยงและห่างจากโคนของช่อดอกอ่อนที่เกิดจากการฉีกออกจาก บริเวณรอยต่อระหว่างฐานของช่อดอกอ่อนและสามารถพบจุดกำเนิดของยอดใหม่หลังจากการ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน การตอบสนองต่อการปฏิชีวนะ Kanamycin ของชิ้นส่วนกาบใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนพบว่า ปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ตายทั้งหมดที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร Kanamycin ปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์และเชียงใหม่พังก์ตายทั้งหมดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม ต่อลิตร Kanamycin และจากการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อ และการเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียร่วมกับ ชิ้นส่วนพืชพบว่า วิธีการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนกาบใบในสารละลายอะโกรแบคทีเรียที่ ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมบนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำ เงินบนชิ้นส่วนกาบใบมากที่สุดเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนจุดสีน้ำเงินเท่ากับ 8.00 จุด ต่อชิ้นส่วน วิธีการปลูกเชื้อโดยการจุ่มชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนในสารละลายอะโกรแบคทีเรียที่ ประกอบด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1305.2 ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงร่วม บนกระดาดกรองที่ชุ่มด้วย สารละลาย glucose 10 mM และ acetosyringone (AS) 100 μ M ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำ เงินบนชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนมากที่สุดเท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนจุดสีน้ำเงินเท่ากับ 13.33 จุดต่อชิ้นส่วน

บรรณานุกรม

- คนัษ บุญเกียรติ และ อังสนา อัครพิศาล. 2540. ชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 237 น.
- ทิพย์สุตา อนันกุล. 2540. การขยายพันธุ์กระเจียวพลอยทักษิณเบอร์ A 033 ในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 182 น.
- การเตรียมชุดยีน. 2549. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <http://www.se-ed.com>. (20 กรกฎาคม 2549).
- นพณีย์ โทบุญฐานนท์, ศิริรัตน์ จงแสง และ ปวีณา นวมเจริญ. 2545. ระบบการผลิตต้นปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) ในสภาพปลอดเชื้อระดับอุตสาหกรรม. น.14. ใน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ม.ป.พ.
- พิมพ์ใจ อาภาวัชรุทธิ์, ถกพลวรรณ ศิริสวัสดิ์ และ ฉันทนา สุวรรณธาดา. 2539. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด. น. 86-93. ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- พรรณธิดา แพทยานันท์. 2543. การเลือกตำแหน่งบนช่อดอกปทุมมาที่เหมาะสมต่อการเป็นชิ้นส่วนตั้งต้นในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 21 น.
- พิศิษฐ์ วรอุไร. 2534. เทคโนโลยีการผลิตหัวพันธุ์ไม้ดอกประเภทหัวเทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ. น.51-53 ใน สมาคมไม้ดอกไม้ประดับแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ม.ป.พ.
- วรภรณ์ อุคมดี. 2547. การพัฒนาของตาดอกและการขยายพันธุ์ปทุมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 108 น.
- วิภาดา ทองทักษิณ และ พิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. กสิกร 67 (5) : 415-419.
- สุพัตรา สระธรรม. 2541. การเจริญเติบโตของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้จากลำต้นของกระเจียวในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 258 น.
- สุรวิษ สุวรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง 128 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 น.
- อภิชาติ ชิดบุรี. 2539. การขยายพันธุ์คาลาในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 198 น.

- โอฬาร พิทักษ์. 2542. ไม้ดอกเมืองร้อนไทยยังฉายแววในตลาดโลก. *เคหการเกษตร* 23(8): 126-131.
- Aida, R., Y. Hirose, S. Kishimoto and M. Shibata. 1999. *Agrobacterium tumefactions* - mediated transformation of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Science* 18(1) : 1-7.
- Babu, K.N., K. Samsudeen and M. J. Ratnambal 1993. Direct regeneration of plant from immature inflorescence of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) by culture. *Hort. Abstr.* 63(7): 5386.
- Barthkur, M. P. and D. N. Bordoloi. 1994. Micropropagation of *Curcuma amada* Roxb. *Hort. Abstr.* 64(4): 421.
- Boase, M. R., J. M. Bradley and N. K. Borst. 1998. An improved method for transformation of regak pelargonium (*Pelargonium Xdomesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 139(1): 59-69.
- Bunya, K., S. Ketsa and D. G. Van. 2004. Postharvest Physiology of *Curcuma alismatifolia* flower. *Postharvest Biology and Technology* 34: 219-226.
- Chai, M.L., C.J. Xu and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm - like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae* 96: 213-224.
- Chittenden, F.J. and P.M. Synge. 1981. *Royal Horticultural Society dictionary of Gardening*. vol.2 . London : Oxford University Press. 2316 p.
- Choi, S.K. and D. C. Kim . 1993. The study on the clonal multiplication of ginger through *in vitro* culture of shoot apex. *Hort. Abstr.* 63(7): 5389.
- Dahlgren, R.M.T., H.T. Clifford and P.F Yeo. 1985. *The families of the Monocotyledons* Springer verlag. New York: n.p. 520p.
- Godoy-Hernandez, G., E.A. Berzunza and H.L. Miranda-Ham. 2006. *Agrobacterium* mediated transient transformation of marigold (*Tagetes erecta*) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84 : 365-368.
- Herath, S. P., T. Suzuki and K. Hattori. 2005. Factors influencing *Agrobacterium* mediated genetic transformation of kenaf. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82: 201-206.
- Hiei, Y. and Komari T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Blo.* 35: 205-218.

- Hiei, Y. and Komari T. 2006. Improved protocols for transformation of Indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 85: 271-283.
- Hoque, M.E., J.W.Mansfield and M. H. Bennett. 2005. *Agrobacterium* mediated transformation of Indica rice genotypes :an assessment of factors affecting the transformation effeiciency. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 82: 45-55.
- Hu, T., S. Metz, C. Chay and J. Fry. 2003. *Agrobacterium* mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. **Plant Cell Report** 21: 1010-1019.
- Huetteman, C.A. and J.E. Preece, 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 33: 105-119
- Kingsman, S.M. and A.J. Kingsman. 1988. **Genetic Engineering: An Introductory to Gene Analysis and Exploitation in Eukaryotes**. Oxford: Blackwell Scientific. 236 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol.Plant** 15: 473-417.
- Nontaswatsri, C. and S.Fukai. 2005. *Agrobacterium* – mediated genetic transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) using leaf explants derived from *in vitro* plants. **Tech. Bull.** (57): 15-19.
- Nontaswatsri, C., S. Fukai and M. Goi 2004. Revised cocultivation conditions produce effective *Agrobacterium* – mediated genetic transformation of carnation. (*Dianthus caryophyllus* L.). **Plant Science** 166: 59-68.
- Prakash, S., R. Elangomathavan and S. Ignacimuthu. 2004. Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. Plantlets from rhizome and leaf sheat explant . **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 78: 159 -165.
- Prathanturarug, S., N. Soonthornchareonnon and P. Saralamp. 2005. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants precultured in thidiazuron – supplemented liquid medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 80: 347 -35.
- Sandararaj, D.D. and G. Thulasidas. 1976. **Botany of Field Crops**. Delhi: The macmillan Company of India Ltd. 508 p.
- Suzuki, S., K. Supaibulwatana and M. Nakano. 2001. Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *Orientalis* (Leighton) Leighton

via *Agrobacterium* – mediated transformation of embryogenic calli. **Plant Science** 161: 89-97.

Takanashi, M., K. Irifune and H. Mrikawa. 1996. Starvation treatment increase transient expression frequency of a foreign gene introduced into *Eustoma grandiflorum* root tissues by particle bombardment. **Plant Tissue Culture Letter** 13: 311-315.

Wannakrairoj, S. 1997. Clonal micropropagation of Patumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep) **Kasetsart J. (Nat .Sci)** 31: 353-356.

Winkelmann,T., K. Kaviani and M. Serrek. 2005. Development of a shoot regeneration protocol for genetic transformation in *Pelargonium zonale* and *Pelargonium peltatum* hybrids. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 80: 33-42.

Yan Y., Z. Wang. 2007. Genetic transformation of the mediated plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens* – mediated method. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 88: 175 -184.

ภาคผนวก ก

ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์, ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของจำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ และตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปรียบเทียบจำนวนการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบและช่อดอกอ่อนของปทุมมาแต่ละสายพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์

ตารางผนวก 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	306.67	76.67	0.68 ^{ns}
Error	10	1133.33	113.33	
Total	14	1440.00		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เพอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	306.67	76.67	0.68 ^{ns}
Error	10	1133.33	113.33	
Total	14	1440.00		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	493.33	123.33	0.69 ^{ns}
Error	10	1800.00	180.00	
Total	14	2293.33		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	493.33	123.33	0.69 ^{ns}
Error	10	1800.00	180.00	
Total	14	2293.33		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	493.33	123.33	0.69 ^{ns}
Error	10	1800.00	180.00	
Total	14	2293.33		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	640.00	160.00	1.60 ^{**}
Error	10	1000.00	100.00	
Total	14	1640.00		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิด
ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	640.00	160.00	1.60 **
Error	10	1000.00	100.00	
Total	14	1640.00		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิด
ยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	640.00	160.00	1.60 **
Error	10	1000.00	100.00	
Total	14	1640.00		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	906.67	226.67	1.79 ^{ns}
Error	10	1266.67	126.67	
Total	14	2173.33		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	906.67	226.67	1.79 ^{ns}
Error	10	1266.67	126.67	
Total	14	2173.33		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช็อคก้อ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2000.00	500.00	4.41*
Error	10	1133.33	113.33	
Total	14	313.33		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช็อคก้อ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2000.00	500.00	4.41*
Error	10	1133.33	113.33	
Total	14	313.33		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(Analysis of variance) เปรู์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2000.00	500.00	4.41*
Error	10	1133.33	113.33	
Total	14	313.33		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรู์เซ็นต์การเกิด ยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2440.00	610.00	6.54**
Error	10	933.33	93.33	
Total	14	3373.33		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2440.00	610.00	6.54**
Error	10	933.33	93.33	
Total	14	3373.33		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 20 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2440.00	610.00	6.54**
Error	10	933.33	93.33	
Total	14	3373.33		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่
จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	81.23	1.66	7.34**
Error	145	401.33	2.77	
Total	149	482.56		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่
จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	167.43	41.86	6.40**
Error	145	948.87	6.54	
Total	149	1116.29		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	249.63	62.41	8.40**
Error	145	1077.23	7.43	
Total	149	1326.86		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ภาคผนวก 20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	386.71	96.68	12.18**
Error	145	1150.47	7.93	
Total	149	482.56		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	325.23	81.31	9.72**
Error	145	1212.67	8.36	
Total	149	1537.89		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	426.87	106.72	12.56**
Error	145	1231.97	8.49	
Total	149	1658.83		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	520.91	130.23	13.59**
Error	145	1388.97	9.58	
Total	149	1909.87		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	541.69	135.42	13.63**
Error	145	1440.90	9.94	
Total	149	1982.59		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2.91	0.72	1.50 ^{ns}
Error	145	70.43	0.48	
Total	149	73.34		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 26 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	2.04	0.51	0.94 ^{ns}
Error	145	79.03	0.55	
Total	149	81.07		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 27 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	15.91	3.98	1.27 ^{ns}
Error	145	454.87	3.14	
Total	149	470.77		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance)จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	4.57	1.14	1.42 ^{ns}
Error	145	116.90	0.81	
Total	149	121.47		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 29 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 14 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	4.37	1.09	1.15 ^{ns}
Error	145	137.90	0.95	
Total	149	142.27		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 16 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	12.30	3.08	2.24 [*]
Error	145	199.57	1.38	
Total	149	211.87		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 31 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 18 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	31.09	7.77	4.40 **
Error	145	256.00	1.77	
Total	149	287.09		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 32 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance)จำนวนยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา 5 สายพันธุ์ หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 20 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	4	83.63	20.91	9.07**
Error	145	334.27	2.31	
Total	149	417.89		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 33 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์สโนไวท์ หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	487.58	69.65	18.12**
Error	232	892.00	3.84	
Total	239	1379.58		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 34 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกด หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	331.53	47.36	43.10**
Error	232	254.97	1.09	
Total	239	586.49		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 35 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่ไวท์ หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	269.16	38.45	38.41**
Error	232	232.23	1.00	
Total	239	501.39		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 36 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่เรด หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	283.80	40.54	53.77**
Error	232	174.93	0.75	
Total	239	458.73		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 37 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนกาบใบของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่พิกซ์ หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	186.13	26.59	66.14**
Error	232	93.27	0.40	
Total	239	279.40		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 38 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์สโนว์ไวท์ หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	487.58	69.65	18.12**
Error	232	892.00	3.84	
Total	239	1379.58		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 39 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์ช่อมรกด หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	331.53	47.36	43.10**
Error	232	254.97	1.09	
Total	239	586.49		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 40 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมา สายพันธุ์เชิงใหม่ไวท์ หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	269.16	38.45	38.41**
Error	232	232.23	1.00	
Total	239	501.39		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 41 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่เรด หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	283.80	40.54	53.77**
Error	232	174.93	0.75	
Total	239	458.73		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 42 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เปรียบเทียบการเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของปทุมมาสายพันธุ์เชียงใหม่พิงค์ หลังจากทำการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์

SOU	df	SS	MS	F
Treatment	7	186.13	26.59	66.14**
Error	232	93.27	0.40	
Total	239	279.40		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงิน จากการทดสอบด้วยสารละลาย X - Gluc และจำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบ และช่อดอกอ่อน

ตารางผนวก 43 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำตาล จากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

SOU	df	SS	MS	F
Trt	11	0	0	0 ^{ns}
A	1	0	0	0 ^{ns}
B	2	0	0	0 ^{ns}
C	1	0	0	0 ^{ns}
A*B	2	0	0	0 ^{ns}
A*C	1	0	0	0 ^{ns}
B*C	2	0	0	0 ^{ns}
A*B*C	2	0	0	0 ^{ns}
Error	24	0	0	
Total	36	0		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 44 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงิน จากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

SOU	df	SS	MS	F
Ttt	11	64.15	5.83	155.28**
A	1	5.83	5.83	155.28**
B	2	11.66	5.83	155.28**
C	1	5.83	5.83	155.28**
A*B	2	11.66	5.83	155.28**
A*C	1	5.83	5.83	155.28**
B*C	2	11.66	5.83	155.28**
A*B*C	2	11.66	5.83	155.28**
Error	24	0.90	0.038	
Total	35	65.06		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 45 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีน้ำเงิน จากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

SOU	df	SS	MS	F
Tt	11	92.33	8.39	16.24**
A	1	16.38	16.38	31.69**
B	2	10.80	5.40	10.45**
C	1	16.37	16.38	31.69**
A*B	2	10.80	5.40	10.45**
A*C	1	16.37	16.38	31.69**
B*C	2	10.80	5.40	10.45**
A*B*C	2	10.80	5.40	10.45**
Error	24	12.40	0.52	
Total	35	104.73		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางผนวก 46 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

SOU	df	SS	MS	F
Trt	11	0	0	0 ^{ns}
A	1	0	0	0 ^{ns}
B	2	0	0	0 ^{ns}
C	1	0	0	0 ^{ns}
A*B	2	0	0	0 ^{ns}
A*C	1	0	0	0 ^{ns}
B*C	2	0	0	0 ^{ns}
A*B*C	2	0	0	0 ^{ns}
Error	24	0	0	
Total	36	0		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวก 47 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์น้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนกาบใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

SOU	df	SS	MS	F
Trt	11	134.75	12.25	147.00**
A	1	12.25	12.25	147.00**
B	2	24.50	12.25	147.00**
C	1	12.25	12.25	147.00**
A*B	2	24.50	12.25	147.00**
A*C	1	12.25	12.25	147.00**
B*C	2	24.50	12.25	147.00**
A*B*C	2	24.50	12.25	147.00**
Error	24	2.00	0.083	
Total	35	136.75		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางผนวก 48 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลาย X-Gluc ของชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร แปลงข้อมูลโดยใช้ $\sqrt{X+1}$

SOU	df	SS	MS	F
Trt	11	421.42	38.31	59.96**
A	1	56.25	56.25	88.04**
B	2	63.17	31.58	49.43**
C	1	56.25	56.25	88.04**
A*B	2	63.17	31.58	49.43**
A*C	1	56.25	56.25	88.04**
B*C	2	63.17	31.58	49.43**
A*B*C	2	63.17	31.58	49.43**
Error	24	15.33	0.64	
Total	35	436.75		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ภาคผนวก ก

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

២០ — ឥរុត

นางสาวสุภาวีย์ บุญญะวัตร

เกิดเมื่อ

27 มกราคม 2526

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนศรีสองรักษ์วิทยา

ຈ.ເຕຍ

พ.ศ. 2548 ปริณูณาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

จ.เชียงใหม่