

## เอกสารอ้างอิง



- กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2523. อ้อย เอกสารวิชาการ เล่ม 1. ธนประดิษฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- กลุ่มบริษัท น้ำตาลมิตรผล. 2542. สหวิทยาการของอ้อยและน้ำตาล. บริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด, กรุงเทพฯ.
- เกศสุคนธ์ มณีวรรณ. 2548. การส่งถ่ายยีนไคตินเนสสู่ข้าว (*Oryza sativa* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เกษม สุขสถาน อุดม พูลเกษและบัญญัติ โกมลวาท. 2520. พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- คณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2551. สถานะการน้ำตาลโลกปี 2550/51 ขององค์การน้ำตาลระหว่างประเทศ. วารสารอ้อยและน้ำตาลทราย 4 (2) : 2.
- จิรวัดน์ สนิทชน และประสิทธิ์ ใจศีล. 2541. รายงานการวิจัยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- แจ่มใส เพียรทอง, อัญชลี พรหมรัตน์ และชินัมพร กุยกานนท์. 2525. แบคทีเรียวิทยา. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ชุตินันท์ เจริญชัย. 2550. พีชวงศ์หญ้า (Gramineae) ในเขตอุทยานแห่งชาติภูเรือ จ.เลย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นาทฤดี ชำนาญพล. 2546. การชักนำให้เกิดต้นใหม่และการส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* เข้าสู่เสาวรสปันธ์ส้มม่วงและพันธุ์สีเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นิตยา สุขทวี. 2549. การโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ดวงกมล ตั้งพงษ์. 2548. การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* สู่ส้มสายน้ำผึ้ง (*Citrus reticulata* Blanco.) และส้มเขียว (*C. sinensis*) วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2528. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของอ้อย. เกษตร 13(2): 118-124.

- บุษกร หอมกระแจะ. 2548. การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* คู่กล้วยไม้เอื้องเงินและ  
มิตสังคโปร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปัทมา ศรีน้ำเงิน. 2546. การถ่ายยีนบางส่วนของ *antisense invertase* เข้าสู่กล้วย. วิทยานิพนธ์  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชไร่นา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โรคใบขาวอ้อยและวิธีการป้องกัน. T&R CELECA PRODUCTS LTD,  
PART. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พูนพิภพ เกษมทรัพย์. 2549. ชีววิทยา 2. บริษัทด้านสุขภาพการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ.
- มนจลินี กมลธรรม. 2545. การชักนำให้เกิดต้นใหม่และการส่งถ่ายยีนสู่ผู้เรียนพันธุ์หมอนทองและ  
พันธุ์ชะนี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ยุพา ผึ้งน้อย. 2542. จุลชีววิทยาทั่วไป. โปรแกรมวิทยาศาสตรบัณฑิตประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และ  
เทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครราชสีมา, นครราชสีมา.
- รัตนา ขามฤทธิ์. 2550. การส่งถ่ายยีน *Chitinase* คู่อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) พันธุ์ Phil  
66-07. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วารารณ ภูตะสุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรมะขาม: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ  
มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น.
- วิศา พิลาโฮม. 2548. การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* คู่เข็มขาวและเอื้องคำ. วิทยานิพนธ์  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วิลาวัลย์ เจริญจิตรตระกูล. 2533. ชีววิทยาของแบคทีเรีย. คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- สมพร ประเสริฐสูงสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. โฟร์เพช,  
กรุงเทพฯ.
- สุมนทิพย์ บุญนาค. 2540. การเจริญเติบโตและฮอร์โมนพืช (Plant growth, development and  
plant hormone). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- \_\_\_\_\_. 2540. เอกสารคำสอนวิชาการ 311725 เทคโนโลยีการส่งถ่ายยีนสู่พืชชั้นสูง. ภาควิชา  
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

- สุมนทิพย์ บุญนาค และเนริสา คุณประทุม. 2540. อิทธิพลของ timentin, cefotaxime และ carbenicilin ต่ออัตราการเจริญของแคลัสต์ถั่วพุ่ม และความสามารถในการจำกัด *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 25(3): 201-207.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. 2551. รายงานพยากรณ์พื้นที่เพาะปลูกอ้อยและผลผลิตอ้อยปีการผลิต 2551/52 แหล่งที่มา : [www.ocsb.go.th/uploads/contents/14/attachfiles/F6486\\_รายงานพยากรณ์2551/52.doc](http://www.ocsb.go.th/uploads/contents/14/attachfiles/F6486_รายงานพยากรณ์2551/52.doc) 14 กันยายน 2551.
- โอชา ประจวบเหมาะ, จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์, ชำนาญ พิทักษ์ และเดลินศักดิ์ วีระวุฒิ. 2527. คู่มือแมลงศัตรูอ้อยและการป้องกันกำจัด. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Abdullah, K., Vazquez, R.I., Prieto, D., Tellez, P., Carmona, E.R., Coego, A., Mernammad, A.S., Mernammad, K.R.K., Muhammad, H.K., Nazir, A.D. and Raziullah, K. 2002. Studie on Callusing and Regeneration Potential of Indigenous and Exotic Sugarcane Clone. **Asian Journal of Plant Sciences** 1: 41-43.
- Aloni, R., Wolf, A., Feigenbaum, P., Avni, A., and Klee, H.J. 1998. The *Never ripe* Mutant Provides Evidence That Tumor-Induced Ethylene Controls the Morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens* -Induced crown Galls on Tomato Stems. **Plant Physiol** 117:841-849.
- Anonymous. 2007. **Agrobacterium-mediated transformation of plants**. Available Srouce : <http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/g1/850.html> March 7, 2010.
- Arencibia, A., Carmona E.R., Tellez, P., Chan, M.T., Yu, S.M., Trujillo, I.E. and Oramas, P.1998. An efficienscy protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Reseach** 7: 213-222.
- Biological Magnetic Resonance Data Bank. 2008. **BMRB acetosyringone**. Available Source: [http://www.bmrwisc.edu/metabolomics/mol\\_summary/?molName=acetosyringone](http://www.bmrwisc.edu/metabolomics/mol_summary/?molName=acetosyringone). March 7, 2010.

- Chen, M., Fry, J.E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W. and Wan Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiol** 11: 971-980.
- Christou, P. 1997. Rice transformation: bombardment. **Plant Molecular Biology** 35: 197-203.
- Ciingalayan, K. and Gallo-Meagiiier, M. 2001. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** 37: 434 – 439.
- Davey, M.R., Curtis, I.S., Garland, K.M.A. and Power, J.B. 1994. **Systematic Association Special Volume No.49**. Clarendon Press, Oxford.
- De Bondt, A., Eggermont, K., Druat P., De Vil, M. and Goderis, I. 1994. Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Barkh): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. **Plant Cell Report** 13: 587- 593.
- Drexel University. 2005. **NSF/DREXEL UNIVERSITY RET PROGRAM 2005: RETAIN TECHNOLOGIES IN THE DELAWARE VALLEY** Available Source: [http:// www.coe.drexel.edu/ret/personalsites/2005/Nyachwaya/researchfocus.html](http://www.coe.drexel.edu/ret/personalsites/2005/Nyachwaya/researchfocus.html). March 7, 2010.
- Franklin, G., Arvinth, S., Sheeba, C. J., Kanchana, M. and Subramoniun, N. 2006. Auxin pretreatment promote regeration of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) midrib segment explants. **Plant Growth Regul** 50:111-119.
- Gama, M., Leite, J.R.P., Cordeiro, A.R. and Cantiffe, D.J. 1996. Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 46: 237-44.
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd. B. and Newbury. H. 1991. The effect of acetosyringone and pH on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Report** 9: 671-675.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal** 6(2): 271-282.



- Honda, H., Ito, T., Yamada, J., Hanai, T. and Matsouka, M. 1999. Selection of Embryogenesis Sugarcane Callus by Analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 87(5): 700-702.
- Humaru, J.M. and Orda, R.A. 1999. The toxicity of antibiotics and herbicides on *in vitro* adventitious shoot formation on *pinus pinea* L. cotyledons. **In Vitro Cellular and developmental Biology** 35(4): 339-343.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nat. Biotech** 14: 745-750.
- Kaur, A., Gill, M.S. Ruma, D. and Gosal S.S. (2008). Enhanced *in vitro* shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime. **Sugar Tech** 10(1):60-64.
- Kenia, T., Gil, A.E., Yanashi, C., NAtacha, S., Alejandro, D.F., Aleins, F., Yamilet, C., and Merardo, P. 2006. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. **Biotechnologia Aplicada** 23: 22-24.
- Kevan M. A. Gartland and Michael R. Davey. 1995. **Agrobacterium Protocols**. Humana Press. New jersey.
- Krish, K.K., Kandasami, P., Rangaraj, N., Kandasamy, T., Chinnaswarni, G., Nirmalkumar, J., Easwaran, K., Joseph A.J., Ramasay, S., Durailagaraja, S. and Ponnuswami, B. 2003. A high throughput functional expression assay system for a defence gene conferring transgenic resistance on rice against the sheath blight pathogen, *Rhizotonia solani*. **Plant Science** 165: 969-976.
- Manickavasagum, M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V.R., Sudhakar, B., Selvaraj, N., Vzsudevan, A. and Kasthuriengan, S. 2004. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Report** 23: 134-143.
- Pipatpanukul, T., Bunnag, S., Theerakulpisut, P. and Kositrakul, M. 2004. Transfarmation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** 26(1): 1-13.

- Pollard, J.W. and Walker, J.M. 1990. **Plant Cell and Tissue Culture**. The Humana Press Inc, New jersey.
- Petri, C., Albuquerque, N., Garcia – Castillo, S., Egea, J. and Burgos, L. 2004. Factor affecting gene transfer efficiency to apricot leaves during early *Agrobacterium*-mediated transformation steps. **J. Hort. Sci. & Biotech** 79(5): 704-712.
- Ramanad, N., Kureel N., Subhanand, N., LaL. M. and Singh, S.B. 2006. Plantlet regeneration through leaf callus culture in sugarcane. **Sugar tech** 8(1):85-87.
- Roberts C.S., Rajagopal S., Smith L.A., Nguyen T.A., Yang W., Nugroho S., Ravi K.S., Vijayachandra K., Harcourt R.L., Dransfield L., Desamero N., Slamet I., Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P., Mayer J.E., Keese P., Kilian K. and Jefferson R.A. 2009. **College of Life Sciences, Zhejiang University** Available Source: [http://www.cls.zju.edu.cn/wulab/cambia/pcambia\\_1305series.htm](http://www.cls.zju.edu.cn/wulab/cambia/pcambia_1305series.htm). May 9, 2010.
- Sam Nyachwaya.2005. **NSF/DREXEL UNIVERSITY RET PROGRAM 2005: RETAIN TECHNOLOGIES IN THE DELAWARE VALLEY** Available Source: <http://www.coe.drexel.edu/ret/personalsites/2005/Nyachwaya/researchfocus.html>. March 7, 2010.
- Shrawat, A. K., Becker, D. and Lorz, H. 2007. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science** 172: 281-290.
- Singh, G., Sandhu, S.K., Meeta, M., Singh, K., Gill, R. and Gosal, S.S. (2008). In vitro induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane. **Euphytica** 160: 35-47.
- Taylor, P.W.J., Ko, H.L., Adkins, S.W., Ratus, C. and Birch, R.G. 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.** 28: 69-78.
- Teixeira da Silva, J.K. and Fukai, S. 2001. The impact of carbencilin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. **Journal of applied Horticulture** 3(1):3-12.

- The American Phytopathological Society. 2000. **Apsnet Feature genomic of plant Associated bacteria: Aglimpse of the future that has become reality –image –crown gall**  
Available Source: <http://www.apsnet.org/online/feature/Genomics/Images/agrochart.htm>.  
March 7, 2010.
- Thomus, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances** 26: 618-631.
- Virupakshi, S., Manjunatha, B.R. and Naik, G.R. 2002. *In vitro* flower induction in callus from a juvenile explants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var. CoC 671. **Current Science** 83(10): 1195-1197.
- Yu, Z., Chen, M., Nie, L., Lu, H., Ming, X., Zheng, H., Qu, L. and Chen, Z. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 58: 87-92.
- Zhangsun, D., Lou, S., Chen, R. and Tang, K. 2007. Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane. **Biologia, Bratislava** 62(4): 386-393.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสและขนาดเฉลี่ยของแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และน้ำตาลซูโครส ระดับต่าง ๆ กัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สูตรที่	อาหารสูตร MS ที่เติม		น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย (ก.) ±std.Error (n=5)	ขนาดเฉลี่ยของแคลลัส (ซม.) ±std.Error (n=5)
	2, 4-D (มก./ล.)	Sucrose (ก./ล.)		
1	3	10	0.246±0.018 <sup>bc</sup>	1.35±0.031 <sup>d</sup>
2	3	15	0.334±0.03 <sup>d</sup>	1.19±0.094 <sup>c</sup>
3	3	30	0.302±0.02 <sup>b</sup>	0.94±0.036 <sup>b</sup>
4	4	10	0.162±0.012 <sup>a</sup>	0.84±0.029 <sup>b</sup>
5	4	15	0.327±0.009 <sup>f</sup>	1.16±0.024 <sup>c</sup>
6	4	30	0.606±0.046 <sup>f</sup>	1.50±0.051 <sup>c</sup>
7	5	10	0.486±0.044 <sup>c</sup>	1.49±0.033 <sup>dc</sup>
8	5	15	0.206±0.012 <sup>ab</sup>	0.86±0.018 <sup>b</sup>
9	5	30	0.272±0.017 <sup>bcd</sup>	0.6±0.082 <sup>a</sup>

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสและขนาดเฉลี่ยของแคลลัสอ้อยพันธุ์ K 92-80 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS คัดแปลงที่เติม 2, 4-D และน้ำตาลซูโครส ระดับต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สูตรที่	อาหารสูตร MS ที่เติม		น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย (ก.) ±std.Error(n=5)	ขนาดเฉลี่ยของแคลลัส (ซม.) ±std.Error (n=5)
	2, 4-D (มก./ล.)	Sucrose (ก./ล.)		
1	3	10	0.06±0.02 <sup>a</sup>	0.35±0.075 <sup>bc</sup>
2	3	15	0.007±0.0034 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>a</sup>
3	3	30	0.0026±0.001 <sup>a</sup>	0.10±0.022 <sup>a</sup>
4	4	10	0.0068±0.003 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>
5	4	15	0.843±0.063 <sup>f</sup>	1.47±0.1 <sup>g</sup>
6	4	30	0.511±0.087 <sup>c</sup>	1.19±0.06 <sup>cf</sup>
7	5	10	0.566±0.026 <sup>cd</sup>	1.12±0.06 <sup>c</sup>
8	5	15	0.703±0.029 <sup>c</sup>	1.40±0.085 <sup>fg</sup>
9	5	30	0.663±0.083 <sup>dc</sup>	1.2±0.16 <sup>cf</sup>

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 7 จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส จำนวนรากเฉลี่ยต่อแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นต่อแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากต่อแคลลัสของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง แคลลัสในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตร ที่	อาหารสูตร MS ที่ เติม		จำนวนต้นเฉลี่ย ต่อแคลลัส ±std.Error(n=5)	จำนวนรากเฉลี่ย ต่อแคลลัส ±std.Error(n=5)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดต้นต่อ แคลลัส	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก ต่อแคลลัส
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)				
1	0	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0
2	0.5	1	0.4±0.4 <sup>a</sup>	0.2±0.2 <sup>a</sup>	20	20
3	1	1	0 <sup>a</sup>	0	0	0
4	2	1	1±1 <sup>a</sup>	0	20	0
5	3	1	1±1 <sup>a</sup>	0	20	0
6	4	1	0 <sup>a</sup>	0	0	0
7	0.5	0.5	15±5.01 <sup>b</sup>	3.6±2.5 <sup>b</sup>	100	40
8	1	0.5	3.8±2.6 <sup>a</sup>	0	60	0
9	2	0.5	5.4±2 <sup>a</sup>	0	80	0
10	3	0.5	0.6±0.4 <sup>a</sup>	0.2±0.2 <sup>a</sup>	40	20
11	4	0.5	0.2±0.2 <sup>a</sup>	0	20	0

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 จำนวนต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส จำนวนรากเฉลี่ยต่อแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นต่อแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากต่อแคลลัสของอ้อยพันธุ์ K 92-80 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง แคลลัสในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตร ที่	อาหารสูตร MS ที่ เติม		จำนวนต้นเฉลี่ย ต่อแคลลัส ±std.Error(n=5)	จำนวนรากเฉลี่ย ต่อแคลลัส ±std.Error(n=5)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดต้นต่อ แคลลัส	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก ต่อแคลลัส
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)				
1	0	0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0
2	0.5	1	8.2±1.39 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	100	0
3	1	1	7±1.09 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	100	0
4	2	1	24±4.38 <sup>c</sup>	2±2 <sup>ab</sup>	100	20
5	3	1	11±4.65 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	80	0
6	4	1	6±2.91 <sup>ab</sup>	0.8±0.48 <sup>ab</sup>	80	40
7	0.5	0.5	5.6±1.96 <sup>ab</sup>	6±1.92 <sup>c</sup>	100	60
8	1	0.5	25.2±4.16 <sup>c</sup>	3.6±1.72 <sup>bc</sup>	100	80
9	2	0.5	6.4±3.34 <sup>ab</sup>	0.2±0.2 <sup>ab</sup>	80	20
10	3	0.5	2.2±1.56 <sup>a</sup>	0.6±0.6 <sup>ab</sup>	40	40
11	4	0.5	1.2±1.2 <sup>a</sup>	1±1 <sup>ab</sup>	20	20

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT

**ตารางที่ 9** ความยาวต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวรากเฉลี่ยต่อแคลลัส ของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 และ K 92-80 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตร ที่	อาหารสูตร MS ที่เติม		ความยาวต้นเฉลี่ยต่อแคลลัส		ความยาวรากเฉลี่ยต่อแคลลัส	
	BA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	±std.Error (ชม.) (n=5)		±std.Error (ชม.) (n=5)	
			มิตรผล99-94	K92-80	มิตรผล99-94	K92-80
1	0	0	0	0	0	0
2	0.5	1	0.08±0.08 <sup>a</sup>	2.32±0.4923 <sup>dc</sup>	0.1±0.1 <sup>a</sup>	0
3	1	1	0	2.61±0.524 <sup>c</sup>	0	0
4	2	1	0.216±0.216 <sup>ab</sup>	2.12±0.251 <sup>dc</sup>	0	0.22±0.22 <sup>abc</sup>
5	3	1	0.316±0.316 <sup>ab</sup>	1.83±0.524 <sup>dc</sup>	0	0
6	4	1	0	1.7±0.483 <sup>cdc</sup>	0	0.14±0.086 <sup>ab</sup>
7	0.5	0.5	1.73±0.322 <sup>c</sup>	1.46±0.459 <sup>bcdc</sup>	0.432±0.26 <sup>b</sup>	0.57±0.244 <sup>bc</sup>
8	1	0.5	0.464±0.276 <sup>ab</sup>	2.17±0.437 <sup>dc</sup>	0	0.69±0.196 <sup>c</sup>
9	2	0.5	0.714±0.253 <sup>b</sup>	1.03±0.468 <sup>abcd</sup>	0	0.1±0.1 <sup>ab</sup>
10	3	0.5	0.24±0.15 <sup>ab</sup>	0.436±0.294 <sup>abc</sup>	0.06±0.06 <sup>a</sup>	0.28±0.171 <sup>abc</sup>
11	4	0.5	0.14±0.14 <sup>ab</sup>	0.214±0.214 <sup>ab</sup>	0	0.24±0.24 <sup>abc</sup>

หมายเหตุ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันที่อยู่ใก้ในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี DMRT



ภาคผนวก ข  
สูตรอาหารสังเคราะห์ Musashige and Skoog's  
และสารเคมีที่ใช้ในการทำPCR

ตารางที่ 10 สารละลายต้นตอของอาหารสังเคราะห์สูตร Musashige and Skoog's (MS)

ส่วนประกอบ	จำนวน (มก./ล.)	ปริมาณที่ใช้จริง (มก./ล.)
<b>สารละลายต้นตอ I</b>		
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	33,000	50
$\text{KNO}_3$	38,000	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,800	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,400	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,400	
<b>สารละลายต้นตอ II</b>		
KI	166	5
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,240	
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,460	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,720	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5	
<b>สารละลายต้นตอ III</b>		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5560	5
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7460	
<b>สารละลายต้นตอ IV</b>		
Inositol	20,000	5
Nicotinic acid	100	
Pyridoxine HCl	100	
Thiamine HCl	100	
Glycine	400	

**อาหารสูตร LB (Luria Broth)**

Bacto-tryphone 10g/l

Bacto-yeast extract 5g/l

NaCl 10g/l

pH 7.0

(ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็งเติม Agar 18 g/l)

**การเตรียมสารละลาย X-glu (X-glu assay buffer)**

94 ml phosphate buffer

1 ml Triton/ethanol

5 ml X-gluc stock

ส่วนประกอบของ Phosphate buffer100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ในอัตราส่วน 1 : 1(v/v)ส่วนประกอบของ Triton/ethanol

100 ml Triton X-100

40 ml 100% ethanol

50 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ส่วนประกอบของ X-gluc stock

10 mg X-gluc

1 ml DMSO (dimethyl Sulfoxide)

**การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR****Extraction buffer**

- 20 mM EDTA

- 100 mM Tris-base (pH8.0)

- 1.4 M NaCl

- 2.0% (w/v) CTAB

- 1.0% PVP-40

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนเติม 2-mercapethanol 1  $\mu$ l ต่อสารละลาย extraction buffer

1 ml

#### TE buffer

- 10 mM Tris-base (pH 8.0)

- 1 mM EDTA (pH 8.0)

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 5X TBE

- 54 g Tris-base

- 27 g Boric acid

- 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 10 mg/ml /RNase A

ชั่ง RNase A 10 mg/ml ละลายใน 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 15 mM NaCl นำมาอุ่นที่ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วเก็บที่ -20 °C

#### การสกัด Plasmid DNA ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1)

สกัดพลาสมิดโดยวิธี Plasmid Miniprepation (Serghini et al., 1989 อ้างใน ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์, 2542) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เพราะเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหารเหลว LB เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 28 °C นานข้ามคืน นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมา 10 มล. ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. คูดสารละลายด้านบนทิ้งไป ละลายตะกอนด้วย TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 100mM, EDTA 1 mM) 350  $\mu$ l
3. เติม Phenol : Chloroform : Isoamy alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 30  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายด้านบนไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม 7.5M ammonium acetate ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M
5. เติม 95% เอทานอล ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

6. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สั่งตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล ผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30  $\mu$ l
7. เติม Rnase A (10 mg/ml) 2  $\mu$ l นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA
8. เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ในตู้แช่แข็ง -20 °C

#### การตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนโดยวิธี GUS assay

ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay โดยนำแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลา 3 วัน มาแช่ในสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide) แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ขำมคืน จากนั้นย้ายไปแช่แอลกอฮอล์ 70% เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสและต้นอ่อนอ้อยบั้นที่กผลการทดลอง



## ประวัติผู้เขียน

นางสาวอาภากร พูลโพธิ์กลาง เกิดวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร เมื่อปี พ.ศ. 2547 และศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อ พ.ศ. 2550 ในระหว่างการศึกษา ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากศูนย์อนุกรมวิธานประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

