บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา

จากการศึกษารวบรวมลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบบอนสี ในเรือนเพาะเลี้ยงพืชทดลองของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 28 สายพันธุ์ สามารถจัดแบ่งกลุ่มบอนสีได้ 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามตำแหน่งของก้านใบ (leaf stalk) ที่เชื่อมติดกับแผ่นใบ (leaf blade) ลักษณะก้านใบ (leaf stalk) และรูปทรงของใบ (leaf shape) ดังนี้

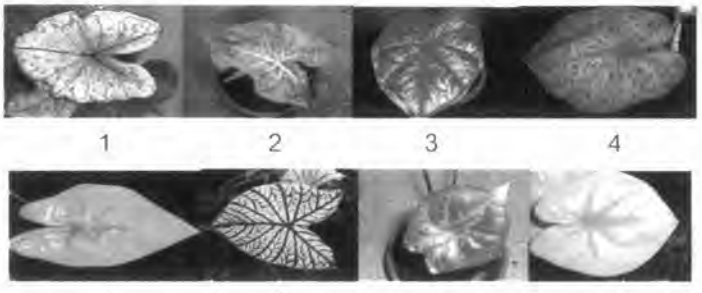
กลุ่มที่ 1 ตำแหน่งของก้านใบค่อนไปทางโคนใบหรือเกือบอยู่กึ่งกลางใบ

1.1 ก้านใบมีลักษณะทรงกลม จำแนกได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะโคนใบ (leaf base) และปลายใบ (leaf apex)

1.1.1 **บอนประเภทใบไทย มีรูปทรงใบ (leaf shape)** เป็นแบบหัวใจ (cordate; heart-shaped) มีโคนใบ (leaf base) เป็นแบบเงี่ยงลูกศร (sagittate) และปลายใบ (leaf apex) เป็นแบบปลายแหลม (acute)

รูปที่ 5. บอนใบไทย

จำแนกได้ 8 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์จุฬาตรีคูณ 2.พันธุ์นกม่วง 3.พันธุ์สร้อยแสงแดง 4.พันธุ์สินสมุทร 5.พันธุ์เหลืองปาริชาติ 6.พันธุ์อิเหนา 7.พันธุ์จังหวัดปัตตานี 8.พันธุ์อาจารย์เจริญ ได้แสดงภาพแต่ละพันธุ์ของบอนสี ตรงตามหมายเลขด้านล่าง ดังรูปที่ 5.1



1 2 3 4

5 6 7 8

รูปที่ 5.1 บอนใบไทย

จำแนกได้ 4 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์ขันทกุมาร 2.พันธุ์เทพพิทักษ์ 3.พันธุ์รัชมงคลและ 4.พันธุ์ศรีสมบูรณ์ ได้แสดงภาพแต่ละพันธุ์ของบอนสี ตรงตามหมายเลขด้านล่าง ดังรูปที่ 7.1

1 2 3 4

รูปที่ 7.1 **บอนใบกาบ**

กลุ่มที่ 2 ตำแหน่งของก้านใบอยู่ตรงรอยฉีกโคนใบและก้านใบมีลักษณะทรงกลม

จำแนกได้ 2 กลุ่ม ตามอัตราส่วนความยาว ต่อ ความกว้าง ของแผ่นใบ (leaf blade)

2.1 **อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมากกว่า 3 เท่าขึ้นไป ได้แก่**

2.1.1 **บอนประเภทใบไผ่ มีรูปทรงใบ** (leaf shape) เป็นแบบรูปแถบ (linear) มีโคนใบ (leaf base) เป็นแบบรูปลิ่ม (cuneate) และปลายใบ (leaf apex) เป็นแบบเรียวแหลม (acuminate)

รูปที่ 8. **บอนใบไผ่**

จำแนกได้ 3 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์ไผ่สีดา 2.พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา 3.พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเหนือ ได้แสดงภาพแต่ละพันธุ์ของบอนสี ตรงตามหมายเลขด้านล่าง ดังรูปที่ 8.1

1 2 3

รูปที่ 8.1 **บอนใบไผ่**

2.2 **อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง น้อยกว่า 3 เท่า จำแนกได้ 2 ประเภท** ตามลักษณะส่วนเว้าของฐานโคนใบ (หูใบ)ตรงฐานโคนใบ (leaf base) คือ ช่วงล่างของใบที่ยื่นจากจุดที่เส้นใบมาจรดกันตรงกลางใบ (สะดือ) แยกออกเป็น 2 ส่วน

2.2.1 **ไม่มีส่วนเว้าของฐานโคนใบ (หูใบ)เลยหรือส่วนเว้าของฐานโคนใบ (หูใบ)สั้นมากเป็นบอนประเภทใบยาวมีรูปทรงใบ** (leaf shape) เป็นแบบรูปหอก (lanceolate) มีโคนใบ (leaf base) เป็นแบบรูปลิ่ม (cuneate) และมีปลายใบ (leaf apex) เป็นแบบยาวคล้ายหาง (caudate)

รูปที่ 9. **บอนใบยาว-รูปคล้ายหอก** (lanceolate)

จำแนกได้ 2 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์แสงสุรีย์ 2.พันธุ์เหลืองเจ้าคุณ ได้แสดงภาพแต่ละพันธุ์ของบอนสี ตรงตามหมายเลขด้านล่าง ดังรูปที่ 9.

1 2

รูปที่ 9.1 **บอนใบยาว-รูปคล้ายหอก** (lanceolate)

2.2.2 **มีส่วนเว้าของฐานโคนใบ (หูใบ) เป็นบอนประเภทใบยาวมีรูปทรงใบ (leaf shape)** เป็นแบบหัวใจ (heart-shaped) มีโคนใบ (leaf base) เป็นแบบรูปหัวใจ (cordate) และมีปลายใบ (leaf apex) เป็นแบบแหลม (acute)

รูปที่ 10. บอนใบยาว-รูปหัวใจ (ชิด) (cordate)

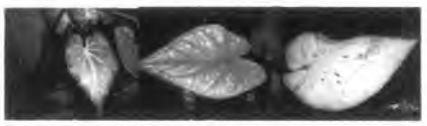
จำแนกได้ 5 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์หนุมานอมพลับพลา 2.พันธุ์ธิดาสวรรค์ 3.พันธุ์จอมทัพ 4.พันธุ์กวนอิม 5. พันธุ์สุวรรณภูมิ ได้แสดงภาพแต่ละพันธุ์ของบอนสี ตรงตามหมายเลขด้านล่าง ดังรูปที่ 10.1

1 2 3 4 5

รูปที่ 10.1 บอนใบยาว-รูปหัวใจ (ชิด) (cordate)

รูปที่ 11. บอนใบยาว-รูปหัวใจ (ห่าง) (cordate)

จำแนกได้ 3 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์คุณหญิง 2.พันธุ์เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์ 3.พันธุ์ปิ่นรัตน์ ได้แสดงภาพแต่ละพันธุ์ของบอนสี ตรงตามหมายเลขด้านล่าง ดังรูปที่ 11.1



1 2 3

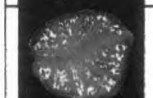
รูปที่ 11.1 บอนใบยาว-รูปหัวใจ (ห่าง) (cordate)

การจำแนกสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถจำแนกบอนสีตามตำแหน่งของก้านใบ ได้ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

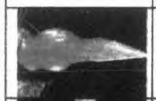
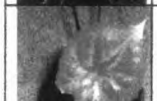
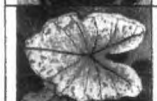
กลุ่มที่ 1. คือกลุ่มที่มีตำแหน่งของก้านใบค่อนไปทางโคนใบหรือเกือบอยู่กึ่งกลางใบ และกลุ่มที่ 2.คือกลุ่มที่มีตำแหน่งก้านใบอยู่ตรงส่วนรอยแยกของโคนใบ ซึ่งกลุ่มที่หนึ่งสามารถจำแนกได้สองกลุ่มย่อยตามลักษณะของก้านใบ โดยกลุ่มที่ก้านใบมีลักษณะทรงกลม แยกได้เป็นกลุ่มบอนสีใบไทย ซึ่งมีรูปทรงใบแบบหัวใจ และกลุ่มบอนสีใบกลม ซึ่งมีรูปทรงใบแบบวงกลม และกลุ่มที่ก้านใบมีลักษณะแบน จำแนกได้หนึ่งกลุ่ม คือ กลุ่มบอนสีใบกาบ กลุ่มที่ 2.คือกลุ่มที่มีตำแหน่งของก้านใบอยู่ตรงรอยฉีกโคนใบ แบ่งได้สองกลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมากกว่า 3 เท่า แยกได้เป็นกลุ่มใบไผ่ และกลุ่มที่มีอัตราความยาวต่อความกว้างน้อยกว่า 3 เท่า ได้เป็นกลุ่มใบยาว ซึ่งในกลุ่มใบยาวยังมีลักษณะของใบที่ต่างกัน คือ บอนสีใบยาว-รูปร่างคล้ายหอก บอนสีใบยาว-รูปหัวใจ (ชิด) และบอนสีใบยาว-รูปหัวใจ (ห่าง)

ในการศึกษาทางด้านสัญฐานวิทยาของบอนสีได้แสดงลักษณะต่างๆ ของบอนสีที่ศึกษาในตารางที่ 1. คำศัพท์ที่ใช้แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์บอนสี 28 พันธุ์ที่ได้สำรวจเบื้องต้นยังคงใช้คำศัพท์ที่วงการบอนสีนิยมใช้เรียกกัน เช่น กระดูก หมายถึง เส้นกลางใบ เส้น หมายถึง เส้นใบขนาดเล็กๆ (vein) สะดือ หมายถึง จุดที่เส้นใบมาจรดกันตรงกลางใบ หูใบ หมายถึง ส่วนเว้าของฐานโคนใบ และลักษณะอื่นๆ ให้ดูในหน้า 9-11

ตารางที่ 1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์บอนสี 28 พันธุ์ที่ได้สำรวจเบื้องต้น

ภาพ	ชื่อพันธุ์	ประเภท	พื้นใบ	กระดูก	เส้น	สะดือ	เม็ด	วิ่งพร่า	หนุนทราย	หูใบ	ก้านใบ	เสี้ยน	สะพานหน้า	สะพานหลัง	สาแหรก
	จ.กระบี่	ใบกลม	ขาวอมชมพู	ชมพูสด	ชมพูสด	ชมพูสด	-	ชมพู	-	สั้น	ชมพู	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
	จ.นราธิวาส	ใบกลม	แดงดำ	แดง	แดง	แดง	ขาวลอย	-	-	ชิด	แดง	-	-	-	-
	จ. ราชบุรี	ใบกลม	เขียว	แดง	แดง	แดง-ดำ	ใหญ่-ขาว	ชมพู	เขียวอ่อน	ใหญ่	แดงดำ	แดงเข้ม	น้ำตาลดำ	ดำ	เขียวแก่
	ขันทกุมาร	ใบกาบ	แดงเข้ม	แดง	แดง	แดง	-	-	-	สั้นมน	มีแข้ง	-	-	-	
	เทพพิทักษ์	ใบกาบ	เขียว-แดง	แดงเข้ม	แดงเข้ม	แดงเข้ม	-	แดง	-	สั้น	มีแข้ง	-	-	-	-
	รัชมงคล	ใบกาบ	ขาว	เขียวขาว	เขียวขาว	เขียวขาว	-	เขียว	-	-	มีแข้ง	-	-	-	-
	ศรีสมบูรณ์	ใบกาบ	เขียว	ชมพูเข้ม	ชมพูอ่อน	ชมพู	-	ชมพู	-	หูสั้นรัดเสมอสะดือ	มีแข้ง	น้ำตาลแดง	น้ำตาล	น้ำตาลแดง	ขาวเขียว

ตารางที่ 1. (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์บอนสี 28 พันธุ์ที่ได้สำรวจเบื้องต้น

ภาพ	ชื่อพันธุ์	ประเภท	พื้นใบ	กระดูก	เส้น	สะดือ	เม็ด	วิ่งพร่า	หนุนทราย	หูใบ	ก้านใบ	เส้ียน	สะพานหน้า	สะพานหลัง	สาแหรก
	ไผ่มนต์เมืองเหนือ	ใบไผ่	แดงอ่อน	แดงเข้ม	แดงเข้ม	แดงเข้ม	-	-	-	ไม่มีหูใบ	น้ำตาล	-	ดำ	-	-
	ไผ่ศรีจันทรา	ใบไผ่	เขียว-ชมพู	แดง	แดง	แดง	-	ชมพู	-	ไม่มีหูใบ	เขียวอ่อน	-	-	-	-
	ไผ่สีดา	ใบไผ่	แดง	แดง	แดง	แดง	-	-	-	ไม่มีหูใบ	เขียว	-	-	ดำ	ดำ
	จ.ปัตตานี	ใบไทย	เขียวเข้ม	แดง	แดง	แดง	-	ชมพูเข้ม	เขียวอ่อน	เล็ก	น้ำตาลแดง	น้ำตาล	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	ดำ
	จุฬาตรีคูณ	ใบไทย	ขาว	เขียว	เขียว	เขียวจุดแดง	ใหญ่-แดง	ขาว	เขียวอ่อน	ใหญ่	เขียวเข้ม	น้ำตาล	ดำ	ดำ	น้ำตาลเข้ม
	นกม่วง	ใบไทย	เขียว	ขาว	ขาว	ขาวจุดม่วง	เล็ก-ม่วง	ม่วง	ขาว	ใหญ่	เขียว	เขียวอ่อน	ขาว	ขาว	เขียว
	สร้อยแสงแดง	ใบไทย	แดง	แดง	แดง	แดง	ชมพูเข้ม	-	-	ยาว	ชมพูเข้ม	น้ำตาล	-	-	-

ตารางที่ 1. (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์บอนสี 28 พันธุ์ที่ได้สำรวจเบื้องต้น

ภาพ	ชื่อพันธุ์	ประเภท	พื้นใบ	กระดูก	เส้น	สะดือ	เม็ด	วิ่งพร่า	หนุนทราย	หูใบ	ก้านใบ	เสี้ยน	สะพานหน้า	สะพานหลัง	สาแหรก
	สินสมุทร	ใบไทย	เขียว	ชมพู	ชมพูอ่อน	ชมพู	ใหญ่-ชมพู	ชมพูอ่อน	เขียวอ่อน	ใหญ่	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	ดำ	ดำ	น้ำตาลอ่อน
	เหลืองปาริชาติ	ใบไทย	เหลืองอมเขียว	แดง	แดง	แดง	ชมพูอมแดง	ชมพู	-	ยาวเรียว	เขียวก้านมะลิ	น้ำตาลอ่อน	-	-	-
	อ.เจริญ	ใบไทย	เหลือง	ชมพู	ชมพู	ชมพู	-	ชมพู	-	ชิด	เขียว	-	-	-	-
	อิเหนา	ใบไทย	ขาว	เขียวเข้ม	เขียวเข้ม	เขียวเข้ม	-	-	-	ยาว	สีเขียว	-	-	-	-
	กวนอิม	ใบยาว	ขาว	ขาว	ขาว	แดงเข้ม	-	-	-	สั้น	เขียว	เขียวเข้ม	เขียว	เขียว	เขียว
	คุณหญิง	ใบยาว	ชมพู	ขาว	ขาว	ขาว	-	-	-	สั้น	เขียว	-	-	-	-
	จอมทัพ	ใบยาว	เขียวแดง	แดง	แดง	แดง	-	-	-	สั้น	เขียวเข้ม	น้ำตาลแดง	น้ำตาล	น้ำตาล	แดงเข้ม

ตารางที่ 1. (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์บอนสี 28 พันธุ์ที่ได้สำรวจเบื้องต้น

ภาพ	ชื่อพันธุ์	ประเภท	พื้นใบ	กระดูก	เส้น	สะดือ	เม็ด	วิ่งพร่า	หนุนทราย	หูใบ	ก้านใบ	เสี้ยน	สะพานหน้า	สะพานหลัง	สาแหรก
	เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์	ใบยาว	แดง	แดงอมม่วง	แดงอมม่วง	แดง	-	-	-	เรียวยาว	แดงดำ	-	-	-	-
	อิตาสวรรค์	ใบยาว	แดง	ดำม่วง	ดำม่วง	ดำม่วง	-	-	ขาว	ชิด	ดำ	-	-	-	-
	ปิ่นรัศน์	ใบยาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	แดง	แดงอมชมพู	-	-	ชมพูอ่อน	น้ำตาล	-	-	-
	สุวรรณภูมิ	ใบยาว	แดง	แดง	แดง	แดง	-	-	เขียว	ใหญ่	เขียว	เขียวอ่อน	เขียว	เขียว	เขียว
	แสงสุรีย์	ใบยาว	เขียว	เขียวอมขาว	เขียว	แดงชมพู	-	ชมพู	-	ไม่มีหูใบ	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	ดำ	ดำ	น้ำตาลอ่อน
	หนุมานอมพลับพลา	ใบยาว	เขียว	ชมพูเข้ม	ชมพูเข้ม	ชมพูเข้ม	เด็ก-ขาว	ชมพู	-	เล็ก	เขียวเข้ม	น้ำตาล	เขียวเข้ม	เขียวเข้ม	น้ำตาล
	เหลืองเจ้าคุณ	ใบยาว	เหลืองอมเขียว	ชมพูอ่อน	ชมพูอ่อน	แดงเข้ม	-	-	-	ไม่มีหูใบ	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	น้ำตาล

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบอนสีบนพื้นฐานดีเอ็นเอ

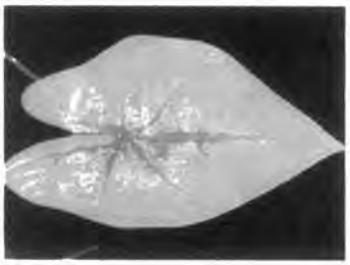
ตารางที่ 2. ภาพตัวอย่างและลักษณะทั่วไปของบอนสีที่นำมาทดลองสกัดดีเอ็นเอ

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ภาพ
กลุ่มที่ 1 ใบกลม รหัส 1	**จังหวัดกระบี่** เป็นบอนใบกลม พื้นใบสีขาวอมชมพู กระดูกและเส้นสีชมพู ปลายใบมน ใบหนา ขอบใบสีเขียวเข้ม ก้านใบสีชมพู มีเสี้ยนสีน้ำตาลอ่อน (พิชาน, 2549)	
กลุ่มที่ 1 ใบกลม รหัส 2	จังหวัดนราธิวาส ลักษณะเป็นบอนใบกลม พื้นใบสีแดง กระดูกและเส้นสีแดง มีเม็ดสีขาว ปลายใบมน ขอบใบมีเม็ดสีน้ำตาลอมเขียว กระจายอยู่ริมขอบ ก้านใบสีแดง (พิชาน, 2549)	
กลุ่มที่ 1 ใบกลม รหัส 3	อาจารย์เจริญ ลักษณะเหมือนบอนใบไทยและมีขอบใบค่อนข้างกลมเหมือนใบกลม พื้นใบสีเหลือง กระดูกและเส้นสีชมพู ปลายใบมน ก้านใบสีเขียว (พยนต์ ชื่นบาน, 2549)	
กลุ่มที่ 1 ใบกาบ รหัส 4	เทพพิทักษ์ ลักษณะเป็นบอนใบกาบ ก้านใบมีแข้งอยู่ปลายสุดของโคนใบ แผ่นใบรูปใบโพธิ์ หูใบสั้น ขอบใบห่อเข้าเป็นกระทง ปลายใบแหลมและงอขึ้น พื้นใบบริเวณขอบสีเขียวอ่อน ตรงกลางเป็นสีชมพู กระดูกและเส้นสีแดงเข้ม มองเห็นเป็นลายชัดเจน (พิชาน, 2549)	
กลุ่มที่ 1 ใบกาบ รหัส 5	ขันทกุมาร ลักษณะเป็นบอนใบกาบ พื้นใบสีแดงเข้ม ขอบใบยก กระดูกและเส้นสีแดง ก้านสีลายบัว (พิชาน, 2549)	

ตารางที่ 2. (ต่อ) ภาพตัวอย่างและลักษณะทั่วไปของบอนสีที่นำมาทดลองสกัดดีเอ็นเอ

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ภาพ
กลุ่มที่ 1 **ใบกาบ** **รหัส** 6	รัชมงคล ลักษณะเป็นบอนใบกาบ เมื่อต้นเล็ก พื้นใบสีขาว กระดูกและเส้นสีเขียว วิ่งพร่าสีเขียว เมื่อต้นใหญ่ พื้นใบสีขาว กระดูกและเส้นสีขาว กาบใหญ่สีขาว (สมาคมบอนสีแห่งประเทศไทย, 2540)	
กลุ่มที่ 2 **ใบไผ่** **รหัส** 7	ไผ่สีดา ลักษณะเป็นบอนใบไผ่ ปลายใบแหลมไม่มีหูใบ พื้นใบสีแดง ขอบใบเป็นลอน กระดูกและเส้นสีแดง ก้านใบสีเขียวสะพานหลังและสาแหรกสีดำ (พยนต์ ชื่นบาน, 2549)	
กลุ่มที่ 2 **ใบไผ่** **รหัส** 8	ไผ่มนต์เมืองเหนือ ลักษณะเป็นบอนใบไผ่ ปลายใบแหลม ไม่มีหูใบ พื้นใบสีแดงอ่อน กระดูกและเส้นสีแดงเข้ม ก้านใบสีน้ำตาล สะพานหน้าสีดำ (พยนต์ ชื่นบาน, 2549)	
กลุ่มที่ 2 **ใบไผ่** **รหัส** 9	ไผ่ศรีจันทรา ลักษณะเป็นบอนใบไผ่ ปลายใบแหลม ไม่มีหูใบ กลางพื้นใบมีสีชมพูแล้วไล่หาสีเขียวไปถึงขอบ กระดูกและเส้นสีแดง วิ่งพร่าสีชมพู ก้านใบสีเขียวอ่อน (พยนต์ ชื่นบาน, 2549)	
กลุ่มที่ 1 **ใบไทย** **รหัส** 10	อิเหนา ลักษณะเป็นบอนใบไทย ทรงใบรูปหัวใจสั้นป้อม ปลายแหลม หูใบยาวฉีกลึกเกือบถึงสะดือ ก้านใบอยู่ประมาณกึ่งกลางใบ พื้นใบสีขาว กระดูกและเส้นสีเขียวเข้ม ขอบใบสีเขียว (พิชาน, 2549)	

ตารางที่ 2. (ต่อ) ภาพตัวอย่างและลักษณะทั่วไปของบอนสีที่นำมาทดลองสกัดดีเอ็นเอ

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ภาพ
กลุ่มที่ 1 **ใบไทย** **รหัส** 11	สร้อยแสงแดง ลักษณะเป็นบอนใบไทย ทรงใบรูปหัวใจ หูใบยาวฉีกลึกแต่ไม่ถึงสะดือ สะโพกกว้าง ปลายใบแหลม พื้นใบสีแดง มีเม็ดสีเขียวอมเทาหรือเม็ดสีชมพูเข้มกระจายอยู่ตามบริเวณขอบใบ กระดูกและเส้นสีแดงเว้าลงไปในเนื้อใบ ก้านใบสีชมพูเข้มเกือบน้ำตาล (พิชาน, 2549)	
กลุ่มที่ 1 **ใบไทย** **รหัส** 12	เหลืองปาริชาติ ลักษณะเป็นบอนใบไทยค่อนข้างป้อม ทรงใบรูปหัวใจ สะโพกกว้าง ปลายใบแหลม หูใบยาวเรียวฉีกลึกเกือบถึงสะดือ ก้านใบสีแดงอยู่ประมาณกึ่งกลางใบ พื้นใบสีออกไปทางเหลืองอมเขียวเล็กน้อย กระดูกและเส้นสีแดง มีเม็ดสีม่วงอ่อนกระจายประปรายทั่วใบ (พิชาน, 2549)	
กลุ่มที่ 2 **ใบไทย** **รหัส** 13	อิดาสวรรค์ ลักษณะเป็นบอนใบยาว ลักษณะใบป้อม สะโพกกว้าง ปลายใบเรียวแหลม หูใบหุบเข้าชิดกัน พื้นใบสีแดง รอบขอบใบสีเขียว กระดูกและเส้นสีออกม่วงดำ (พิชาน, 2549)	
กลุ่มที่ 2 **ใบไทย** **รหัส** 14	เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์ ลักษณะเป็นบอนใบยาว ปลายใบเรียวแหลม หูใบเรียวยาวปลายหุบเข้ามาซ้อนกันตรงกลาง มีรอยฉีกลึกถึงสะดือ พื้นใบสีแดง กระดูกและเส้นสีแดงอมม่วง มองเห็นลายชัดเจน ขอบใบสีเขียว (พิชาน, 2549)	

ตารางที่ 2. (ต่อ) ภาพตัวอย่างและลักษณะทั่วไปของบอนสีที่นำมาทดลองสกัดดีเอ็นเอ

รหัสตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ภาพ
กลุ่มที่ 2 **ใบไทย** **รหัส** 15	ปิ่นรัตน์ ลักษณะเป็นบอนใบยาว ลักษณะคล้ายใบโพธิ์ เมื่อต้นเล็กพื้นใบไม่มีเม็ดสีแดง พอโตเต็มที่พื้นใบสีขาว วิ่งพร่าสีแดงอมชมพู มีเม็ดสีแดงกระจายทั่วใบ กระดูกและเส้นสีขาว ขอบใบเป็นคลื่นมีสีเขียวก้านใบสีชมพูอ่อน มีเสี้ยนสีน้ำตาลแก่ (สมาคมบอนสีแห่งประเทศไทย, 2540)	

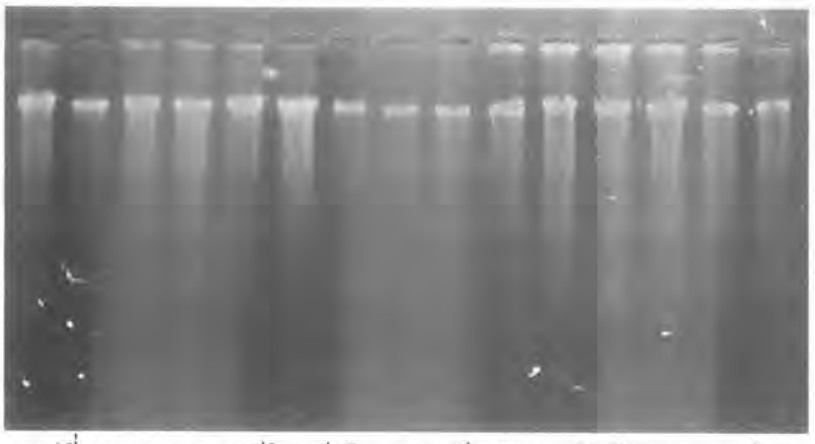
ผลการทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบอนสีบนพื้นฐานดีเอ็นเอ เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการพิสูจน์ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการทดลอง โดยได้ดำเนินการแยกชนิดของบอนสีตัวอย่างเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตำแหน่งก้านใบและยังแบ่งกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่มย่อยดังตารางที่ 2

กลุ่มที่ 1 ตำแหน่งของก้านใบค่อนไปทางโคนใบหรือเกือบอยู่กึ่งกลางใบ แบ่งได้ 3 กลุ่มย่อย
กลุ่มบอนใบกลม คือ 1.พันธุ์จังหวัดกระบี่ 2.พันธุ์จังหวัดนราธิวาส 3.พันธุ์อาจารย์เจริญ
กลุ่มบอนใบกาบ คือ 4.พันธุ์เทพพิทักษ์ 5.พันธุ์ขันทกุมาร 6.พันธุ์รัชมงคล
กลุ่มบอนใบไทย คือ 10.พันธุ์อิเหนา 11.พันธุ์สร้อยแสงแดง 12.พันธุ์เหลืองปาริชาติ

กลุ่มที่ 2 ตำแหน่งของก้านใบอยู่ตรงรอยฉีกโคนใบ แบ่งได้ 2 กลุ่มย่อย
กลุ่มบอนใบไผ่ คือ 7.พันธุ์ไผ่สีดา 8.พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเหนือ 9.พันธุ์ไผ่ศรีศรีจันทรา
กลุ่มบอนใบยาว คือ 13.พันธุ์ธิดาสวรรค์ 14.พันธุ์เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์ 15.พันธุ์ปิ่นรัตน์

2.2 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างบอนสีทั้ง 3 กลุ่ม 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยการวัด OD ที่ 260, 280 และ 320 และแยกดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้าด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าสามารถสกัดจีโนมดีเอ็นเอของบอนสีได้ทั้ง 15 ตัวอย่าง (รูปที่ 12) แถบจีโนมดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจน มีส่วนของแถบจางน้อย แสดงให้เห็นถึงคุณภาพของดีเอ็นเออยู่ ในระดับดีและระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้มาก ไม่พบอาร์เอ็นเอปนเปื้อน ในตัวอย่างที่สกัดได้ โดยดูจากบริเวณด้านล่างของเจลที่ไม่มีแถบสีของกรดนิวคลีอิกชนิดใด เมื่อนำดีเอ็นเอไปทดสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเพาะพบว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพพอที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้



รูปที่ 12. แสดงแถบจีโนมดีเอ็นเอบอนสี 15 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel electrophoresis เรียงตามลำดับดังนี้

1. พันธุ์ จ.กระบี่	2. พันธุ์ จ.นราธิวาส	3. พันธุ์อาจารย์เจริญ
4. พันธุ์เทพพิทักษ์	5. พันธุ์ขันทกุมาร	6. พันธุ์รัชมงคล
7. พันธุ์ไผ่สีดา	8. พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเมืองเหนือ	9. พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา
10. พันธุ์อิเหนา	11. พันธุ์สร้อยแสงแดง	12. พันธุ์เหลืองปาริชาติ
13. พันธุ์ธิดาสวรรค์	14. พันธุ์เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์	15. พันธุ์ปิ่นรัตน์

การตรวจสอบเชิงปริมาณของดีเอ็นเอบอนสีที่สกัดได้จากบอนสี 15 สายพันธุ์ โดยการวัดการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 260, 280 และ 320 นาโนเมตร และการตรวจสอบความสัมพันธ์ในเชิงสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เป็นดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบอนสี 15 สายพันธุ์ และความสัมพันธ์ในเชิงสัดส่วนของค่าดูดกลืนแสงและปริมาณดีเอ็นเอ

ตัวอย่างพันธุ์บอนสี	ค่า OD (nm)				ปริมาณ DNA (µg/µl)	ปริมาณรวม (ng/µl)
	260	280	320	260/280		
1. จ.กระบี่	0.0765	0.0310	0.0290	2.4677	1.530	1,530
2. จ.นราธิวาส	0.0275	0.0200	0.0020	1.3750	0.550	550
3. อาจารย์เจริญ	0.0375	0.0206	0.0145	1.8200	0.750	750
4. เทพพิทักษ์	0.0650	0.0421	0.0310	1.5439	1.300	1,300
5. ขันทกุมาร	0.0480	0.0400	0.0650	1.2000	0.960	960
6. รัชมงคล	0.0375	0.0145	0.0150	2.5862	0.755	755
7. ไผ่สีดา	0.0715	0.0390	0.0400	1.8330	1.430	1,430
8. ไผ่มนต์เมืองเหนือ	0.0230	0.0140	0.0020	1.6000	0.460	460
9. ไผ่ศรีจันทรา	0.0605	0.0370	0.0360	1.6350	1.310	1,310
10. อิเหนา	0.0680	0.0411	0.0105	1.6545	1.360	1,360
11. สร้อยแสงแดง	0.0290	0.0200	0.0020	1.4500	0.580	580
12. เหลืองปาริชาติ	0.0380	0.0212	0.0105	1.7900	0.760	760
13. อิดาสวรรค์	0.0370	0.0209	0.0130	1.7703	0.740	740
14. เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์	0.0310	0.0198	0.0075	1.5656	0.620	620
15. ปิ่นรัตน์	0.0370	0.0120	0.0310	3.0830	0.740	740

ผลการพิจารณาด้านคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และความสัมพันธ์ของสัดส่วน A_{260}/A_{280} พบว่าสารละลายดีเอ็นเอของบอนสีแต่ละพันธุ์ มีความเข้มข้นเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปได้ แต่ในด้านคุณภาพพบว่ามี 7 ตัวอย่าง ที่ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่า 1.65 ซึ่งเป็นภาวะที่อาจมีโปรตีนหรือฟีนอลเหลืออยู่จากขั้นตอนการสกัด ได้แก่ ตัวอย่าง พันธุ์จังหวัดนราธิวาส พันธุ์เทพพิทักษ์ พันธุ์ขันทกุมาร พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเหนือ พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา พันธุ์สร้อยแสงแดง และพันธุ์เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์ อีก 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างพันธุ์อิเหนา พันธุ์เหลืองปาริชาติ พันธุ์ธิดาสวรรค์ พันธุ์อาจารย์เจริญ พันธุ์ปิ่นรัตน์ และพันธุ์จังหวัดกระบี่ ตามลำดับ พบว่าดีเอ็นเอ ที่สกัดได้มีการปะปนของโมเลกุลที่ไม่ใช่ดีเอ็นเออยู่ เนื่องจากได้ค่าการวัดคุณภาพของสารละลาย ดีเอ็นเอมากกว่า 1.85 ยกเว้นตัวอย่างบอนสีพันธุ์ไผ่สีดา พันธุ์อาจารย์เจริญ พันธุ์เหลืองปาริชาติ และพันธุ์ธิดาสวรรค์ ที่มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 ซึ่งเป็นค่าดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอตัวอย่างเริ่มต้นในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยเทคนิค AFLP ต่อไป

2.3 เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

2.3.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP เริ่มจากการคัดเลือกตัวอย่างพันธุ์บอนสีมา 1 ตัวอย่างในการทดลองได้คัดเลือกพันธุ์จังหวัดกระบี่เป็นตัวแทนอย่างสุ่ม การวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ *Mse*I และไพรเมอร์ *Eco*RI ทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ จำนวน 9 คู่ ดังตารางที่ 4ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ได้แก่ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mse*I

M1=M-CA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA 3'
M2=M-CAA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAA 3'
M3=M-CAC	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAC 3'
E1=E-AA	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAA 3'
E2=E-AAC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAC 3'
E3=E-AAG	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAG 3'

ตารางที่ 4 คู่ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี AFLP

E/M	M1	M2	M3
E1	1. M1E1	2. M2E1	3. M3E1
E2	4. M1E2	5. M2E2	6. M3E2
E3	7. M1E3	8. M2E3	9. M3E3

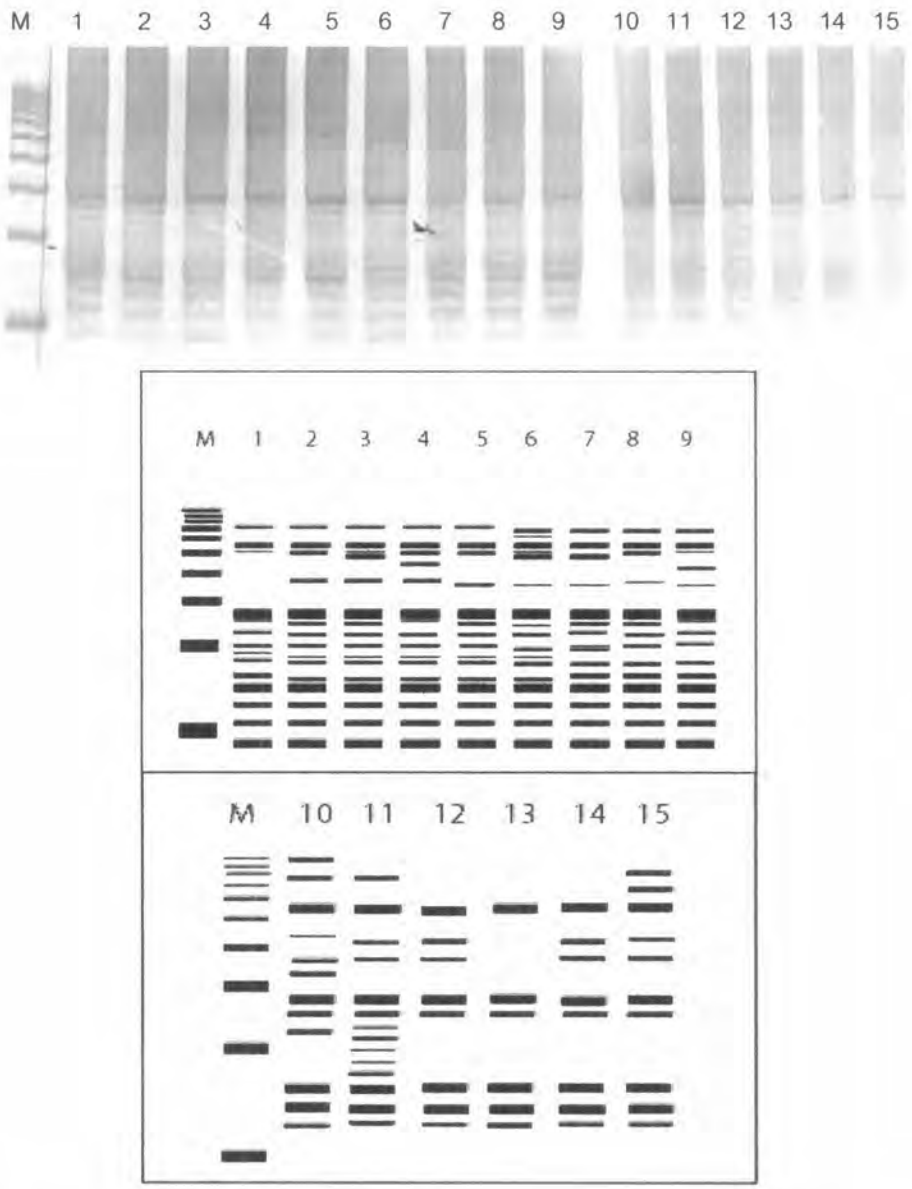
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

รูปที่ 13 แถบดีเอ็นเอบอนสีพันธุ์ จ.กระบี่ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 9 คู่ ที่ตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เรียงตามลำดับดังนี้

M = 100 base pair maker
1 = M-CA/ E-AA
2 = M-CAA/ E-AA
3 = M-CAC/ E-AA
4 = M-CA/ E-AAC
5 = M-CAA/ E-AAC
6 = M-CAC/ E-AAC
7 = M-CA/ AAG
8 = M-CAA/ AAG
9 = M-CAC/ AAG

จากรูปที่ 3 พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนพอที่จะนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อได้ โดยไพรเมอร์คู่ M-CAA/ E-AA ให้แถบดีเอ็นเอ 16 แถบ, M-CAC/ E-AA 9 แถบ, M-CAA/ E-AAC 6 แถบ, M-CAA/ AAG 1 แถบ และ M-CAC/ AAG 6 แถบ ตามลำดับ จากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ไพรเมอร์คู่ที่ 5 M-CAA/ E-AAC สามารถเห็นรายละเอียดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดเจนที่สุด จึงนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP ได้ ในบอนสี 15 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะใบ วิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ M-CAA/ E-AAC ได้ผลเป็นดังรูปที่ 4



รูปที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M-CAA/ E-AAC ตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (ภาพบน) และภาพสเก็ตแทนแถบดีเอ็นเอที่พบ เรียงตามลำดับดังนี้

M = 100 base pair maker

1. พันธุ์ จ.กระบี่
2. พันธุ์ จ.นราธิวาส
3. พันธุ์อาจารย์เจริญ
4. พันธุ์เทพพิทักษ์
5. พันธุ์ขันทกุมาร
6. พันธุ์รัชมงคล
7. พันธุ์ไผ่สีดา
8. พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเหนือ
9. พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา
10. พันธุ์อิเหนา
11. พันธุ์สร้อยแสงแดง
12. พันธุ์เหลืองปาริชาติ
13. พันธุ์ธิดาสวรรค์
14. พันธุ์เจ้าหญิงซนิตนิรันดร์
15. พันธุ์ปิ่นรัตน์

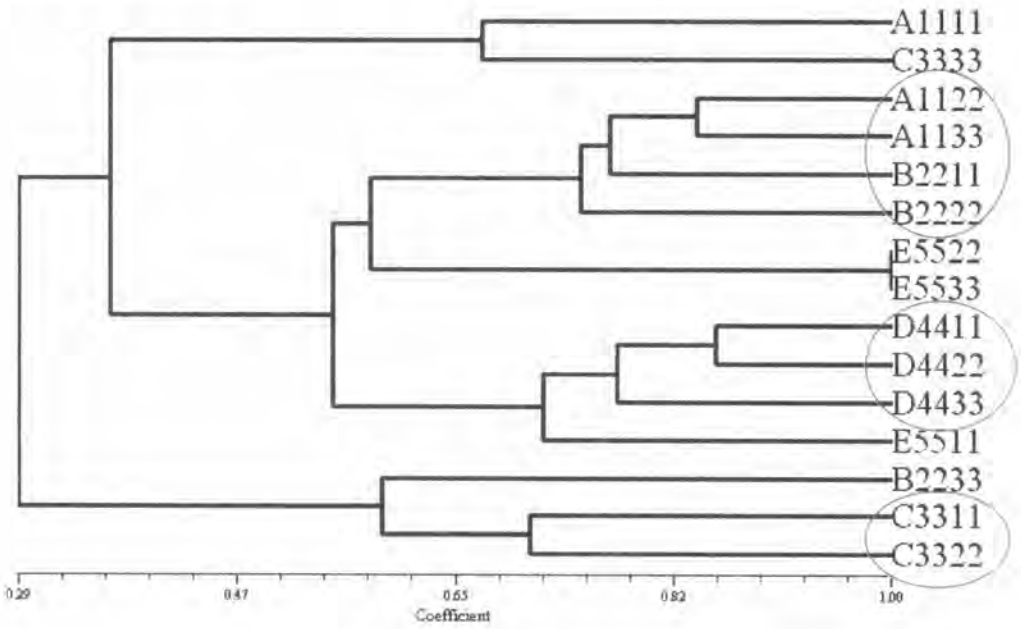
ตารางที่ 5 การให้คะแนนจำนวนแถบดีเอ็นเอ 15 ตัวอย่างที่ได้ในไพรเมอร์ M-CAA/ E-AAC

พันธุ์ที่ / แถบที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
9	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
11	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
12	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
13	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
14	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
15	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0

จากความแตกต่างกันของจำนวนแถบ และตำแหน่งการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากนั้นทำการเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic bands) โดยให้ 1 แทนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่ง (loci) นั้น ๆ และ 0 แทนตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ได้ผลเป็นดังตารางที่ 5 ตารางดังกล่าวใช้เป็นตารางในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์บอนสีแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในขั้นตอนต่อไป

ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems) (Rohlf, 1993) โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity Coefficient) ของ Dice (1945) ให้ค่าคำนวณ genetic distance ระหว่าง genotype ของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาได้ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เป็นดังรูปที่ 5 และเมื่อนำค่า genetic distance สร้างเป็น Genetic Distance Matrix ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยอาศัยการ

วิเคราะห์ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Mean Arithmetic method (UPGMA) (Jneath and Sokal, 1973)ให้ผลดังรูปที่ 5



รูปที่ 15 ความแตกต่างของพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างบอนสีเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP จัดกลุ่ม
ด้วยวิธี UPGMA และใช้โปรแกรม NTSYS-pc Ver. 2.0 เรียงตามลำดับดังนี้

A1111 = พันธุ์ จ.กระบี่
A1122 = พันธุ์ จ.นราธิวาส
A1133 = พันธุ์ อ.เจริญ
B2211 = พันธุ์เทพพิทักษ์
B2222 = พันธุ์ขันทกุมาร
B2233 = พันธุ์รัชมงคล
C3311 = พันธุ์ไผ่สีดา
C3322 = พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเมืองเหนือ
C3333 = พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา
D4411 = พันธุ์อิเหนา
D4422 = พันธุ์สร้อยแสงแดง
D4433 = พันธุ์เหลืองปาริชาติ
E5511 = พันธุ์ธิดาสวรรค์
E5522 = พันธุ์เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์
E5533 = พันธุ์ปิ่นรัตน์

ข้อมูล matrix ที่ได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc ver. 20 ช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างบอนสีได้ โดยพบว่าเทคนิค AFLP นี้สามารถแยกใบกลม พันธุ์ จ.กระบี่ และพันธุ์ อ.เจริญ ใบกาบ พันธุ์เทพพิทักษ์ และพันธุ์ขันทกุมาร ใบไผ่ พันธุ์ไผ่สีดา และพันธุ์ไผ่มนต์เมืองเหนือจัดเข้าด้วยกัน และสามารถจัดใบไทย D4411พันธุ์อิเหนา D4422 พันธุ์สร้อยแสงแดงและ D4433 พันธุ์เหลืองปาริชาติ จัดเข้าด้วยกัน

ความแตกต่างของค่าคะแนน genetic distance ที่คำนวณได้ ที่จัดให้บอนสีมีความต่างกันอยู่นี้ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมในตัวอย่างบอนสีสายพันธุ์ต่างๆ เชื่อมโยงโอกาสในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและได้รูปแบบในการจัดกลุ่มตัวอย่างแยกออกเป็นพันธุ์ต่างๆ ได้ และใช้รูปแบบเหล่านั้นในการตรวจสอบและรับรองพันธุ์ อย่างไรก็ดีต้องมีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในรายละเอียดเพื่อตรวจสอบต่อไป

เทคนิค AFLP นี้สามารถให้ข้อมูลได้ถึงขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยอาศัยการมองเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏและไม่ปรากฏ ที่บริเวณตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญในการพิจารณา จึงมีโอกาสวิเคราะห์ ผิดพลาด ซึ่งวิธีการตวรจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ผลที่ละเอียดกว่าน่าจะเป็นวิธีที่เป็นทางเลือกในการดำเนินการต่อยอดในขั้นถัดไป

2.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ copia-like retro transposon

จากการทดลองนอกเหนือจากการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอแล้ว การศึกษายังมุ่งสนใจการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณของ copia-like retro transposon และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ copia-like retro transposon จำเพาะต่อบริเวณยีนจากทรานโพซอนได้แถบดีเอ็นเอเป็นดังรูปที่ 6

รูปที่ 16 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย PCR ไพรเมอร์ copia-like retro transposon และ ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เรียงตามลำดับดังนี้

M = 100 base pair maker

1. พันธุ์ จ.กระบี่	2. พันธุ์ จ.นราธิวาส	3. พันธุ์อาจารย์เจริญ
4. พันธุ์เทพพิทักษ์	5. พันธุ์ขันทกุมาร	6. พันธุ์รัชมงคล
7. พันธุ์ไผ่สีดา	8. พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเมืองเหนือ	9. พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา
10. พันธุ์อิเหนา	11. พันธุ์สร้อยแสงแดง	12. พันธุ์เหลืองปาริชาติ
13. พันธุ์ธิดาสวรรค์	14. พันธุ์เจ้าหญิงชนิตนิรันดร์	15. พันธุ์ปิ่นรัตน์

โดยพบแถบดีเอ็นเอจากทั้งหมด 15 ตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีขนาดต่างกัน 2 แถบ คือแถบเล็กขนาด 250 นิวคลีโอไทด์และแถบใหญ่ขนาด 450 นิวคลีโอไทด์ ในการทดลองนี้มีความสนใจในแถบนิวคลีโอไทด์ขนาดใหญ่ที่สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้ประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ จึงได้สุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอและโคลนชิ้นดีเอ็นเอนั้นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10

จากจำนวนโคลนที่คัดเลือกอย่างสุ่มได้ตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวแทนตัวอย่างละ 3 โคลน และเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ copia-like retrotransposon ในบอนสีทั้ง 7 ชนิด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันตั้งแต่ 453 คู่เบสจนถึง 458 คู่เบส การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์โดยวิธี alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W ในภาพรวม ไม่พบความคล้ายคลึงกันของบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชิ้น retro transposon แต่จะพบบางบริเวณที่มี นิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ผลการทำ alignment หน้าถัดไป และผลของลักษณะนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันนี้ สะท้อนความต่างของบอนสีได้เป็นอย่างดี จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และค่า distance เป็นดังตารางที่ 6 และ รูปที่ 7

Sequence 1: A11 453 bp
Sequence 2: A31 453 bp
Sequence 3: A23 455 bp
Sequence 4: A22 456 bp
Sequence 5: A13 453 bp
Sequence 6: A32 454 bp
Sequence 7: A33 455 bp

ตารางที่ 6 หาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Phylip

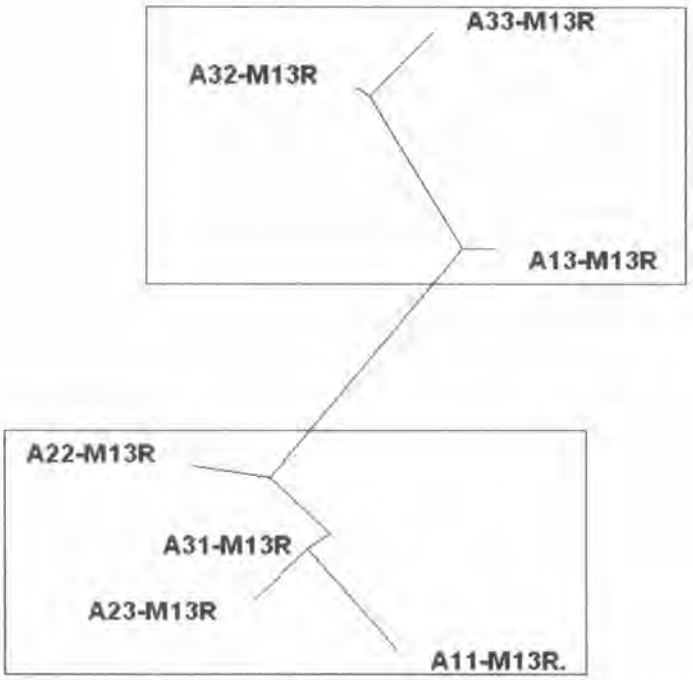
ค่าดิสแทนส์ (Distance)

	A11	A13	A22	A23	A31	A32	A33
A11							
A13	0.958396						
A22	0.535422	0.746638					
A23	0.354133	0.969822	0.524216				
A31	0.273538	0.771057	0.286267	0.194890			
A32	1.827795	0.535818	1.481829	1.666326	1.265574		
A33	2.272258	0.711526	1.744548	1.953069	1.592600	0.237356	

ตารางที่ 7 ค่า Alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม clustal W

```
A31-M13R    GGAAGAGCAGGATTTATCAGAGCCCACAATATCTTAAGAAGAAAGGGCACCCAGTTTCCT 60
A23-M13R    GGAAACCCAGGATTTATCAGAGCCCACAATATCTTAAGAAGAAAGGGTACCCAGTTGCAA 60
A22-M13R    GGAACAACAGAATTTAGCAGGCCACAAAATTCCTTAAGACAATGCGCCACCCAGTTTCCT 60
A11-M13R.   GGAATTTAACCCAAAAACAAATTTCAGGCCAAATTCAAAAGAAGCTGCACCCATTTCCCA 60
A13-M13R    GGAACAACAGAATTTAGGGCCACTTAATACTCCTTCGGACATTGCGCCTTTCAGCGATCT 60
A32-M13R    GGAACAACAGAATTTAGGGCCACTTAATAATCCTTAAAACATTCAGTCTTTTTTTGAATG 60
A33-M13R    GGAACAACAGAATTTATAGTGATATGACGATCGCTGAACCTCTCCGTCGTACGTGGACTA 60
             ****  *       *                   *

A31-M13R    CTTCCCGCGGGGAAATATTTCGAC-ATCATGGGTACCACCAGACAAAACAAACATAGTTT 119
A23-M13R    CTTTTCCCGGGGAAATTTTTCGAA-ACTTAAGGGCCACCCCGAAAAAAGAAACATAGTTT 119
A22-M13R    CTTCCCGCGGGGAAATATTTCGAC-ATTATGGGTACCACCAGAAAAAA-AGAGAAAGCCT 118
A11-M13R.   CCTCCCCCGGAAAAATTTTTCGAA-ATCTAAGGTTCCCCCAAAAAAAACAAATCCAGTTT 119
A13-M13R    CTTCCGGCGAAGAAATTTTTCTAG-CTATTGGGTACCACCATAAAAAAGGAGGGCAGTCT 119
A32-M13R    TGATCCGGAATAAAAAACCACACCCAAAAATCGTAGTATCATATTTTAGGAGGGCAATCT 120
A33-M13R    TCATATGAAATAAAACCCGACACCCAAAAAATGTAGTATCATATTTTAGGAGGGCAATCT 120
                 ***  *     *  * * *   * *

A31-M13R    CTTCTTGGCAGAAAAATACCCCAAAAAAAAAAA--AAATTGGAAAGGGGGAAAATAAAAA 177
A23-M13R    TTCTTTGGGCGAGAATAACCCCAGAAAGGAGAACAAAATTGGAAAGGGGGAAAATAAAAA 179
A22-M13R    CTTCTTGGGGGAAAACTACCCCCAAAAAAAAAA--AATTTGGAAAGGGGGAAAAAAAAAA 176
A11-M13R.   CTTCTTGGCCAAAAAACACCCCAAAACAGGATA--AATTTGGAAAGGGGGAAAAAAAAAA 177
A13-M13R    CTTGTTGGGAAAAATATACCCCTTGAGAAGAGA--GATTTGCAAAGGGGGAAACTGGAGT 177
A32-M13R    CTTGTTGGGAAAAATATACCCGGTGAGAGGCTA--CATTTGCCCCCCCCGGGAACTTGTCA 178
A33-M13R    CTTGTTGGGAAAAACCTACCGGGTGAAAGCCTA--CATTTTTCCCCGGGGGAAGTTGTCA 178
            * **** * *  ***  *   * * **    ** **

A31-M13R    TCTAGGGAAAGTCGACCTGCACCCAATCTAATTCGGGGCAAATTTCAAAGGATTAAGAAT 237
A23-M13R    ATTAAGGGAGGTTTACCTGCGGCCCAACTAAATCCGGGGGAAATTCTGAGGACTTATGAT 239
A22-M13R    CACAGGGAAAGTCGATCGGCACCCAATTTAATTCGGGGCAAAATTCAAAGGAAAAATATT 236
A11-M13R.   ACTAGGGAAATTCAACCGGCCGCCAAATTAATTCCGGGCAAATTTCTAAGGATTAAGAAT 237
A13-M13R    AATTGGGAGGATGTATTGGCGCGCAATCTTATTCGGGGCAAATTTCCATGGATTAAGAAT 237
A32-M13R    ACTCGGGAGGATATTATGGCCCGTGATCGTATTCAAGACAATTTTTTATGGATTAAGAAG 238
A33-M13R    AATCGGGAGGATATTATGGCCCGTGATCGTATTCAAGACAACCAGGGATGGATTAATAAT 238
               **  *   **   *  * ** * *    *** *

A31-M13R    TTTTATTATTAAATA--AGTTATAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGGGCCCCT 295
A23-M13R    TTTTAATATTAAAAA--AGTTGCAAAAAAAAGAAGTGGATACAGATTTTTAAGAGGCCCC 297
A22-M13R    ATTATTTAAAAAGAA--AGTTTTAAAAAAAATAAGTGTAAACAAACTTTAAAGGGGCCCT 294
A11-M13R.   TTTTATTATAAAACA--ATTTAAAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGGGCCTCT 295
A13-M13R    TTTTATTATTAAAGA--AGTTATTGCAAAAATAAGTGTACCAAAATTTTAAACGGCGGGC 295
A32-M13R    GCTTAATAACAAGAAGAATTTGGCATTTTGTTTAATAAGACCATTATAAACAGCGGGCCC 298
A33-M13R    GCGCAATGGAAAGAAGAATTTCTCATACCGCTTGATAAGACCAAAATAAACAGCGGGCCC 298
               * ** * ***       *  * *  * *
```

```
A31-M13R    GAGGTTTTAAAACAAAAATCCTTATTCTTGAATAACTCTTTCCGGGAGGG-GAGGTTGCT 354
A23-M13R    AAAGTTTTAAAACAAAAATCCTTATTCTTGAATAACTCTTTCCGGGAGGG-CAGGTTGCC 356
A22-M13R    GAGGTTTTAAAACAAATATCCTTATTCTCGTGTAGCTCTTTCCGAAAGAGAGATGTTGCT 354
A11-M13R.   AAGGTTTTAAAACGAAATTTCTAATTCTTGAAAAACTCTTTCCGGTAGGT-CAGGTTGCT 354
A13-M13R    CCGGCCCTAGGGTATATACACAAATTCTAAAATAACTCTTATTGTGAGAACTACTTACAT 355
A32-M13R    GA--CTGTAGGGTTTCTCAAAAGATTCCGGAATAACTCTTATTGTGAAACTACGAACATT 356
A33-M13R    GA--CCCTCTCTCTTCTCGCGAGAATATGTAATAACTCTTATTGTGAAACTACGAACGTT 356
                          *       * *    * ***** * *

A31-M13R    TTCACAGGAATAGGAAGAGGTCCCTCTTATTGACCACACCTCTGCCGGCATGGAAGCTTG 414
A23-M13R    TTCACAGGGAGAGGAAGAGGTCCCTCTTATTGACCACACCTCTGCCGGCATGGAAGCTTG 416
A22-M13R    TTCTCAGGAATAGGAAGGGGTCCCCCACATACACCACACCTCTTCTAGCAAGGAAAGTTG 414
A11-M13R.   TTCCCAGGAAAAGCAGGAGGCCCCTCTAATTGACCACACCTCTACCGGCATGCAAGCTGG 414
A13-M13R    TTCACAGGAACGGGAGACTGTGTCTCTCCCCCACCGGAAATTCACCGGCATGGCCGCTTA 415
A32-M13R    TCATTATCACGGGAGTGGATAAGTGTCGGGCCG-TCTTCCTTGACCGGTGTGGATGATAA 415
A33-M13R    CAGTTATCGCGAGACTGCCTACTTGTCTATCCCCTCTTCCTTGACCGGTGTGGATGATAA 416
                                          *  *          * * * *  *

A31-M13R    GCATAATCGTGATCATAGTTGTTTCCGGGGAAAAATTGT--- 453
A23-M13R    GCATAATCGTGATCATAGTTCTTTCTGGGGAAAAATTGT--- 455
A22-M13R    AAATGATCTTGCCCATTCTACTAGGCTGGTGAGGAACATAAT 456
A11-M13R.   GCGAAATCATGCACAAAGCTGTTTCCTGTGAAAAATTGT--- 453
A13-M13R    GCATAATCGTCCGCCTCCTCTCGCGCGGGGGAAAATAT---- 453
A32-M13R    GCATAGGGATCTTCCTCCTCTCGTGAATGAGAGACACAT--- 454
A33-M13R    GCATAGGGATCTTCCTCCTCTCGCCGCTGAAATACCCGT--- 455
                        *    *                *
```



รูปที่ 17 แผนภาพเดนโดรแกรมแสดงความแตกต่างของพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างบอนสี บริเวณ copia like retro transposon ด้วยโปรแกรม phylip

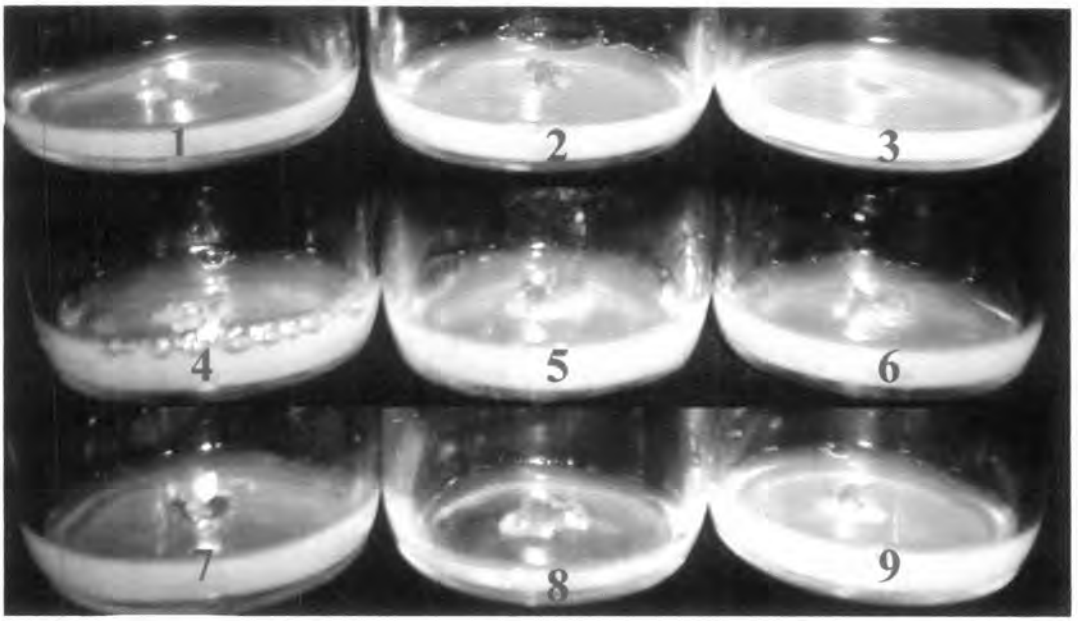
ความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระยะสูงมากเช่นนี้ ทำให้ตัวอย่างเป็นอิสระต่อกัน จึงสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ แยกความแตกต่างในระหว่างพันธุ์ได้โดยตรง อย่างไรก็ดีหากนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาคำนวณหาความแตกต่างโดย การวิเคราะห์ cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Mean Arithmetic method (UPGMA) (Jneath and Sokal, 1973) สามารถแบ่งตัวอย่างบอนสีที่นำมาทดลองทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก มี A13 พันธุ์ อ. เจริญ A32 พันธุ์ไผ่มนต์เมืองเหนือ และ A33 พันธุ์ไผ่ศรีจันทรา ซึ่งเป็นบอนประเภทใบไผ่ 2 พันธุ์ และบอนประเภทใบกลม 1 พันธุ์ ส่วนกลุ่มที่สอง มี A11 พันธุ์ จ.กระบี่ A22 พันธุ์ขันทกุมาร A23 พันธุ์รัชมงคล และ A31 พันธุ์ไผ่สีดา ซึ่งเป็นบอนประเภทใบกาบ 2 พันธุ์ เป็นบอนประเภทใบกลม 1 พันธุ์ และเป็นบอนประเภทใบไผ่ 1 พันธุ์ จากการทดลองทำให้ทราบว่าบอนสีแม้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก แต่การตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ copia-like retro transposon สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างออกจากกันได้ โดยดูจากความต่างกันในลำดับนิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ดีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันในบริเวณ copia-like retro transposon ไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกประเภทของบอนสีออกจากกันได้

3. การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของบอนสีด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้เลือกใช้บอนสีพันธุ์อิเหนาที่มีคุณสมบัติเด่นในการทนต่อสภาวะแวดล้อม มีอัตราการเจริญเติบโตสูง และสามารถขยายพันธุ์ได้ดีกว่าบอนสีพันธุ์อื่นๆ เป็นแคลลัสที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการตอบสนองต่ออาหารสูตร MS ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BA และกลุ่มออกซิน NAA ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยพิจารณาจากเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส จำนวนต้น จำนวนใบ และความสูงของต้นอ่อน เป็นเกณฑ์พิจารณาการตอบสนองของบอนสีที่มีต่ออาหารสูตรต่าง ๆ

การพัฒนาการตอบสนองของใบอ่อนเป็นแคลลัสบนอาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุด โดยการศึกษาปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 คือ อาหารสูตร MS ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 1, และ 2 ppm ตามลำดับ และปัจจัยที่ 2 อาหารสูตร MS ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 1 และ 2 ppm ตามลำดับ สำหรับคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณสมบัติแข็งแรง และเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการศึกษาอาหารสูตรต่าง ๆ ในลำดับขั้นตอนการเจริญจากแคลลัสเป็นต้นอ่อนต่อไปตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการชักนำแคลลัสโดยเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ในสูตรอาหาร MS ที่ร่วมกันระหว่าง BA 1 ppm และ NAA 1 ppm เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุด สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองต่อแคลลัสได้รวดเร็วที่สุด จะเห็นได้ชัดเจนว่าแคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง และมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ คือ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 21.28 มิลลิเมตร แต่อาหารสูตร ที่มี 2 ppm NAA และไม่ใส่ BA นั้นมีการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อเยื่อจากสีเขียวเป็นสีดำบริเวณขอบรอบนอก ดังแสดงในรูปที่ 8

รูปที่ 18 ชิ้นส่วนของใบบอนสีพันธุ์อิเหนาบนอาหาร MS ก่อนนำไปทดสอบอาหารสูตรต่างๆ



รูปที่ 19 การพัฒนาการของใบอ่อนเป็นแคลลัสในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ ระยะการปลูก 8 สัปดาห์

1 = 0 ppm BA 0 ppm NAA 2 = 1 ppm BA 0 ppm NAA

3 = 2 ppm BA 0 ppm NAA 4 = 0 ppm BA 1 ppm NAA

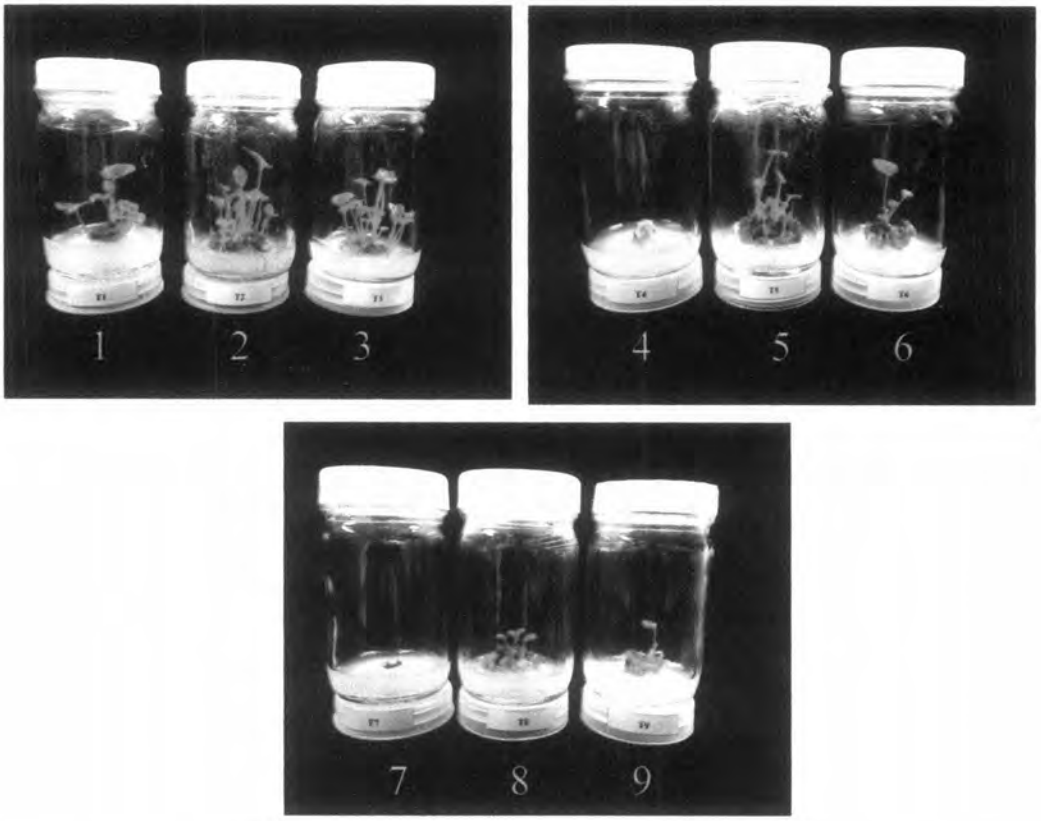
5 = 1 ppm BA 1 ppm NAA 6 = 2 ppm BA 1 ppm NAA

7 = 0 ppm BA 2 ppm NAA 8 = 1 ppm BA 2 ppm NAA

9 = 2 ppm BA 2 ppm NAA

เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสในใบบอนสีแล้ว คือ สูตร 1B ร่วมกับ 1N **จึงใช้อาหารสูตรนี้เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาที่มีความแข็งแรงและปริมาณเพียงพอต่อการศึกษาการชักนำแคลลัสของบอนสีให้เจริญเป็นต้นอ่อนบอนสีที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และNAA ที่** 3 **ระดับความเข้มข้น ได้แก่** 0, 1, **และ** 2 ppm.**ตามลำดับ เป็นเวลา** 8 **สัปดาห์ ได้ผลดังตารางที่** 7

รูปที่ 20 แคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาบนอาหาร MS ก่อนนำไปทดสอบอาหารสูตรต่างๆ



รูปที่ 21 การพัฒนาการของแคลลัสเป็นหน่อในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์

1 = 0 ppm BA 0 ppm NAA
2 = 1 ppm BA 0 ppm NAA
3 = 2 ppm BA 0 ppm NAA
4 = 0 ppm BA 1 ppm NAA
5 = 1 ppm BA 1 ppm NAA
6 = 2 ppm BA 1 ppm NAA
7 = 0 ppm BA 2 ppm NAA
8 = 1 ppm BA 2 ppm NAA
9 = 2 ppm BA 2 ppm NAA

ตารางที่ 8 ผลของ NAA และ BA ที่มีต่อจำนวนต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความสูงของบอนสีขณะเจริญเป็นต้นอ่อนที่ 8 สัปดาห์

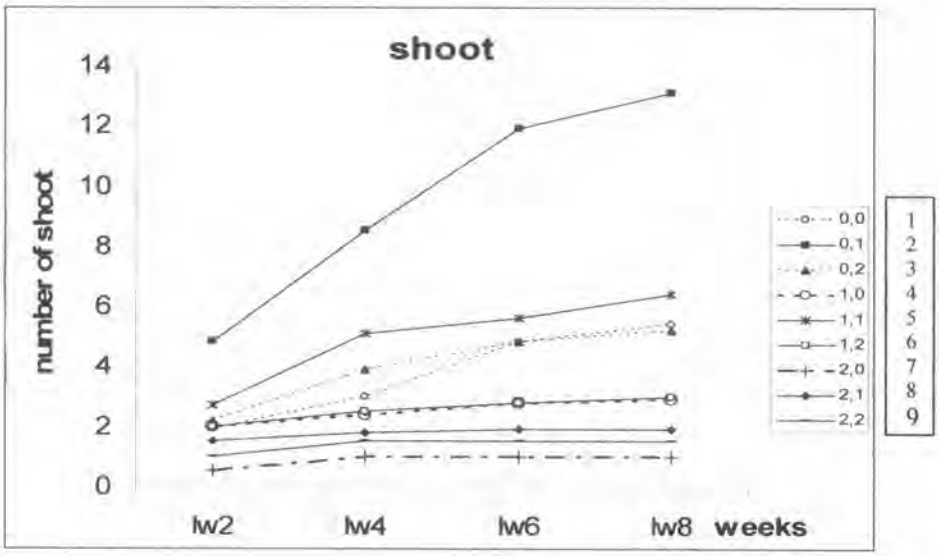
สารควบคุมการเจริญเติบโต	เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (มิลลิเมตร)	จำนวนต้น (ต้น)	จำนวนใบ (ใบ)	ความสูง (มิลลิเมตร)
Control	14.072^{d}	5.4b^{c}	5.7^{b}	32.8b^{cd}
0 ppm NAA 1 ppm BA	18.22^{b}	13.1^{a}	13.7^{a}	35.4^{bc}
0 ppm NAA 2 ppm BA	14.87^{d}	5.2^{c}	5.8^{b}	27^{cde}
1 ppm NAA 0 ppm BA	11.15^{e}	2.9^{d}	3.4^{b}	60.7^{a}
1 ppm NAA 1 ppm BA	21.28^{a}	6.4^{b}	6.8^{b}	26.9^{cde}
1 ppm NAA 2 ppm BA	6.78^{f}	3^{d}	3.2^{b}	20.3^{e}
2 ppm NAA 0 ppm BA	5^{f}	1^{e}	1.2^{d}	26.7^{cde}
2 ppm NAA 1 ppm BA	15.37^{d}	1.9^{de}	2.2^{cd}	22.8^{de}
2 ppm NAA 2 ppm BA	17.14^{dc}	1.5^{e}	1.6^{d}	39.7^{b}
% C.V.	12.52	26.61	19.79	33.05
F-test	*	*	*	*

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

3.1 การพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

การพัฒนาแคลลัสเป็นต้นอ่อนด้วยการใช้อาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในระดับที่แตกต่างกัน สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนแตกต่างกันดังนี้



รูปที่ 22 กราฟค่าเฉลี่ยของต้นอ่อนบอนสีที่ได้จากการชักนำแคลลัสในสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA

1 = 0 ppm BA 0 ppm NAA 2 = 1 ppm BA 0 ppm NAA

3 = 2 ppm BA 0 ppm NAA 4 = 0 ppm BA 1 ppm NAA

5 = 1 ppm BA 1 ppm NAA 6 = 2 ppm BA 1 ppm NAA

7 = 0 ppm BA 2 ppm NAA 8 = 1 ppm BA 2 ppm NAA

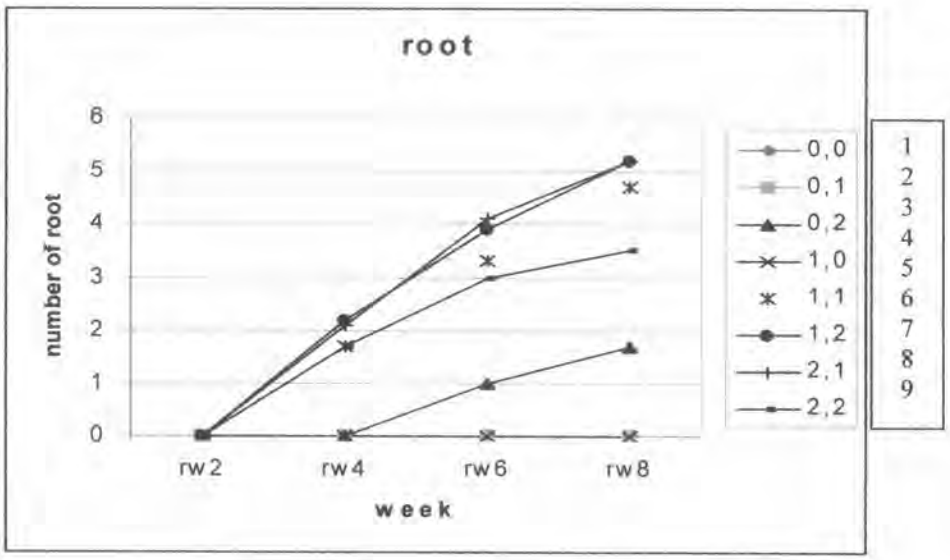
9 = 2 ppm BA 2 ppm NAA

lw2 = สัปดาห์ที่ 2 lw4 = สัปดาห์ที่ 4 lw6 = สัปดาห์ที่ 6 lw8 = สัปดาห์ที่ 8

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสไปเป็นต้น พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างๆ จะมีรูปแบบอัตราการเจริญเป็นยอดอ่อนรูปแบบเดียวกัน คือ มีอัตราการเจริญเป็นยอดอ่อนสูงในช่วงสัปดาห์ที่ 2-4 เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของแคลลัสตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร BA 1 ppm มีอัตราการเจริญเป็นต้นอ่อนเฉลี่ยสูงที่สุด คือสูงถึง 28.0% รองมาคือการเลี้ยงในอาหารสูตร NAA 1 ppm BA 1 ppm, BA 2 ppm ชุดควบคุม NAA 1 ppm, NAA 1 ppm BA 2 ppm, NAA 2 ppm BA 2 ppm, NAA 2 ppm BA 2 ppm และ NAA 2 ppm ที่มีอัตราการเจริญเฉลี่ยเป็นต้นอ่อนช้าที่สุด คือ 16%

3.2 การพัฒนาการเจริญของรากของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในระดับที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารสูตรต่างๆ มีความสามารถในการชักนำให้แคลลัสเกิดการแตกรากได้ในระดับที่แตกต่างกันดังนี้



รูปที่ 23 กราฟค่าเฉลี่ยของจำนวนรากของต้นอ่อนบอนสีที่ได้จากการชักนำแคลลัสในสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA

1 = 0 ppm BA 0 ppm NAA
2 = 1 ppm BA 0 ppm NAA
3 = 2 ppm BA 0 ppm NAA
4 = 0 ppm BA 1 ppm NAA
5 = 1 ppm BA 1 ppm NAA
6 = 2 ppm BA 1 ppm NAA
7 = 0 ppm BA 2 ppm NAA
8 = 1 ppm BA 2 ppm NAA
9 = 2 ppm BA 2 ppm NAA

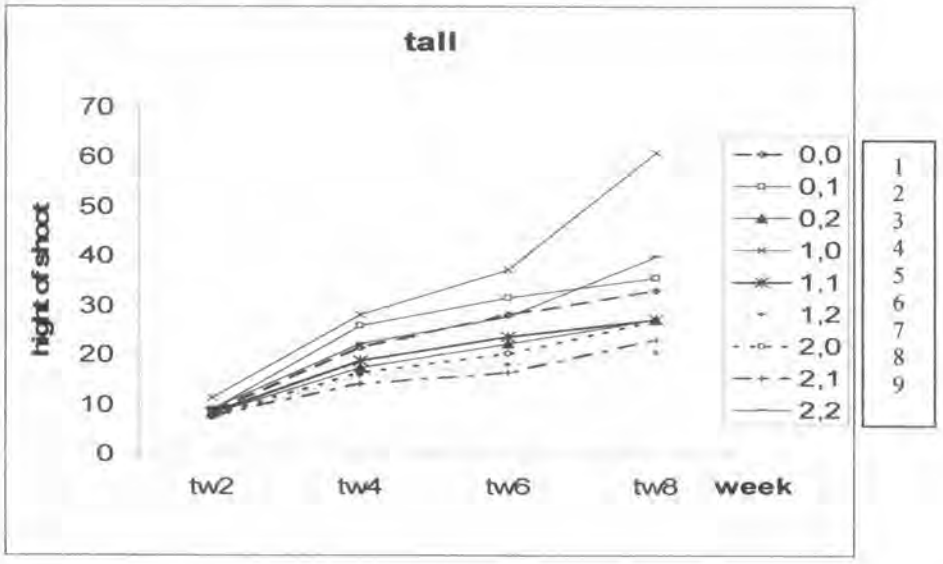
rw2 = สัปดาห์ที่ 2 rw4 = สัปดาห์ที่ 4 rw6 = สัปดาห์ที่ 6 rw8 = สัปดาห์ที่ 8

การพัฒนาแคลลัสเป็นต้นอ่อนโดยศึกษาจำนวนรากแต่ละสัปดาห์พบว่า อาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำให้ต้นอ่อนแตกรากได้แตกต่างกัน โดยอาหารที่สามารถชักนำให้ต้นอ่อนสามารถแตกรากได้นั้นมักจะเริ่มพบการเกิดรากขึ้นภายหลังสัปดาห์ที่ 2 ยกเว้นอาหารสูตร NAA 2 ppm ที่เริ่มมีการพัฒนารากเกิดขึ้นก่อนสัปดาห์ที่ 2 และมีอัตราการแตกรากสูงสุดตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งเมื่อพิจารณาจากช่วงสัปดาห์ที่ 4-6 นั้น พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มอาหารสูตรต่างๆ ได้ 3 สูตร ตามความสามารถในการชักนำให้เกิดการแตกรากได้คือ อาหารสูตร NAA 2 ppm ที่มีอัตราการแตกรากของต้นอ่อนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองมาคืออาหารเลี้ยงต้นอ่อนกลุ่มที่ 2 ที่พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการแตกรากได้

เท่าๆ กัน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ อาหารสูตร NAA 1 ppm BA 1 ppm, สูตร NAA 1 ppm BA 2 ppm สูตร NAA 2 ppm BA 1 ppm และ สูตร NAA 2 ppm BA 2 ppm และอาหารเลี้ยงต้นอ่อน กลุ่มที่ 3 คือ อาหารอาหารในสูตรชุดควบคุม อาหารสูตร BA 1 ppm อาหารสูตร BA 2 ppm อาหารสูตร NAA 1 ppm ไม่สามารถชักนำให้เกิดการแตกรากได้ แต่ในอาหารสูตร BA 2 ppm จะสามารถชักนำให้เกิดการแตกรากได้บ้างเล็กน้อยดังปรากฏในสัปดาห์ที่ 8

3.3 การพัฒนาการเจริญของลำต้นของต้นอ่อนในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในระดับที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารสูตรต่างๆ มีความสามารถในการชักนำให้แคลลัสเกิดการเจริญเป็นต้นอ่อน ที่มีการพัฒนาการเจริญของความสูงขึ้นในระดับที่แตกต่างกันในแต่ละสูตรอาหาร ดังนี้



รูปที่ 24 กราฟค่าเฉลี่ยความสูงของยอดอ่อนบอนสีที่ได้จากการชักนำแคลลัสในสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA

1 = 0 ppm BA 0 ppm NAA
2 = 1 ppm BA 0 ppm NAA
3 = 2 ppm BA 0 ppm NAA
4 = 0 ppm BA 1 ppm NAA
5 = 1 ppm BA 1 ppm NAA
6 = 2 ppm BA 1 ppm NAA
7 = 0 ppm BA 2 ppm NAA
8 = 1 ppm BA 2 ppm NAA
9 = 2 ppm BA 2 ppm NAA

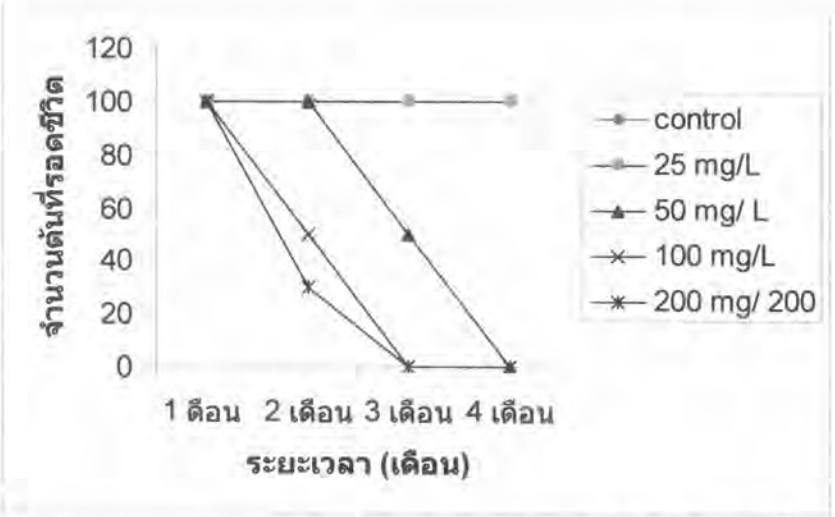
tw2 = สัปดาห์ที่ 2 tw4 = สัปดาห์ที่ 4 tw6 = สัปดาห์ที่ 6 tw8 = สัปดาห์ที่ 8

การศึกษาระดับความสูงของยอดบอนสี ในอาหารแต่ละสูตรพบว่าอัตราการเจริญของยอดต้นอ่อน จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลังสัปดาห์ที่ 2-4 จากนั้นอัตราการเจริญของยอดจะลดลง และเริ่มมีอัตราการเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งในช่วงสัปดาห์ที่ 6-8 ซึ่งอาหารแต่ละสูตรมีความสามารถในการชักนำให้ยอดต้นอ่อนบอนสีสูงได้แตกต่างกัน โดยอาหารสูตร NAA 1 ppm สามารถชักนำให้ยอดต้นอ่อนสูงมากที่สุดตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารสูตรที่ชักนำให้ยอดต้นอ่อนสูงได้น้อยที่สุดมีทั้งสิ้น 5 สูตร คือ อาหารสูตร BA 2 ppm สูตร NAA 1 ppm BA 1 ppm สูตร NAA 1 ppm BA 2 ppm สูตร NAA 2 ppm และอาหารสูตร NAA 2 ppm BA 2 ppm จะมีระดับความสูงของยอดต้นอ่อนเฉลี่ย 20.3 - 27 มิลลิเมตรต่อต้น ซึ่งน้อยกว่าอาหารสูตร NAA 1 ppm ที่มีระดับความสูงของยอดต้นอ่อนเฉลี่ย 60.7 มิลลิเมตรต่อต้น ประมาณ 2.87 เท่า

4. การศึกษาการถ่ายยีนสู่บอนสีด้วยวิธีชักนำด้วยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated transformation)

4.1 การทดสอบอาหารสูตรที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

นำแคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเข็งสูตรดัดแปลง MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาทดสอบความต้านทานสารปฏิชีวนะ โดยใช้ใบมีดแบ่งแคลลัสที่ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ถึง 2 มิลลิเมตร และตัดยอดที่เกิดขึ้นทิ้ง นำไปทดสอบความต้านท่านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยนำแคลลัสที่ตัดเรียบร้อยแล้วไปวางบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วง 15 วันแรกของการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อแคลลัสทั้งหมดยังคงมีสีเขียว เนื้อเยื่อบางส่วนมีสีอ่อนลง แต่ไม่พบเนื้อเยื่อที่แสดงอาการตายซึ่งจะมีลักษณะสีขาวซีดหรือสีน้ำตาลทั้งก้อนแคลลัส ในเดือนที่ 2 เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งคิดอัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อในการทดลองนี้ คำนวณได้จากเนื้อเยื่อที่ยังคงมีส่วนที่มีสีเขียวต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมด ได้ค่าอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสบนอาหารสูตรที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือนคิดเป็นร้อยละ 100,100, 100, 50 และ 30 ตามลำดับ หลังจากนั้นแยกเฉพาะแคลลัสส่วนที่มีสีเขียวมาเลี้ยงต่อบนอาหารคัดเลือกสูตรเดิม พบว่าเนื้อเยื่อดังกล่าวจะตายทั้งหมดภายในเดือนที่ 3 ในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเนื้อเยื่อที่คัดเลือกบนอาหารสูตรที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น จะตายทั้งหมดภายในเดือนที่ 4 ดังรูปที่ 15



รูปที่ 25 กราฟแสดงจำนวนการรอดชีวิตของแคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

ในการทดลองครั้งนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบผลกระทบของสูตรอาหารและสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิมต่อแคลลัสบอนสีที่ถูกตัดยอดและแบ่งให้เล็กลง พบว่าเนื้อเยื่อที่วางบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ เซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 เดือน นั้นยังคงสามารถเจริญเติบโตขยายตัวต่อไปได้ ลักษณะเนื้อเยื่อยังคงมีสีเขียว ไม่พบเนื้อเยื่อที่แสดงอาการตาย จากผลที่ได้นั้น สามารถใช้ยืนยันผลการคัดเลือกเนื้อเยื่อว่ามีผลจากสารปฏิชีวนะกานามัยซินเท่านั้น

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าบอนสีพันธุ์อิเหนามีความไวต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จึงสามารถนำสารปฏิชีวนะกานามัยซินมาใช้ในการคัดเลือกบอนสีได้โดยทำให้ แคลลัสบอนสีตายทั้งหมด ภายในระยะเวลา 3-4 เดือน ดังนั้นในการทดลองถ่ายยีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าสู่บอนสีครั้งนี้ จึงเลือกใช้อาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นต่ำ ที่สามารถทำให้แคลลัสตายได้ทั้งหมด

4.2 การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีน

แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นจะมีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ถึง 1.0 เซนติเมตร แคลลัสบางส่วนมียอดเกิดขึ้นจึงต้องนำก้อนแคลลัสมาแบ่งให้มีขนาดเล็กลงโดยใช้ใบมีดตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.3 ถึง 0.5 เซนติเมตร และตัดส่วนที่เป็นยอดทิ้งไป นำไปเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตต่อไปได้ และแคลลัสบางส่วนจะมีการเจริญเติบโตต่อเป็นยอดจึงมีการตัดยอดทิ้ง และแบ่งแคลลัสที่ได้ ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (1กรัม) เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

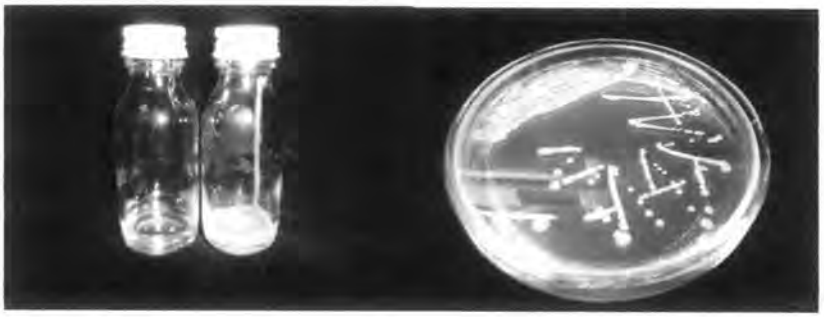
รูปที่ 26 แคลลัสเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายยีน

4.3 วิธีเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียม

เนื่องจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pDFR81 เก็บอยู่ในรูปของ stock เชื้อเป็นเวลานาน จึงจำเป็นต้องชักนำให้เชื้อเจริญเติบโตและสร้างพลาสมิดและเมื่อนำ stock culture มาเกลี่ย (spread) บนอาหารสูตร AB ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อจะเจริญเป็นโคโลนีกระจายอยู่เต็มจานเพาะเชื้อ ได้ภายในระยะเวลา 2-3 วัน โดยไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือแบคทีเรียอื่น

รูปที่ 27 *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pDFR81 เพาะเลี้ยงได้ 3 วัน

เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 เท่าของอาหาร เชื้อมีการเจริญจนทำให้อาหารขุ่นขึ้นภายในเวลา 2-3 วัน นำเชื้อที่ได้วัดค่า OD_{600} ค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.5-1.0 ซึ่งนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการถ่ายยีนด้วยวิธีอะโกรแบคทีเรียมต่อไป รูปที่ 18



รูปที่ 28 การคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pDFR81

4.4 การถ่ายยีนโดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม (Agrobacterium-mediated method)

เมื่อได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว นำชิ้นส่วนดังกล่าวร่วมกับสารแขวนลอยของเชื้อ *A. tumefaciens* แล้วนำมาวางบนอาหารสูตร MS พบว่าเชื้อมีการเจริญรอบๆ ชิ้นของเนื้อเยื่อภายใน 2-3 วัน ลักษณะของเชื้อมีสีขาวขุ่น เป็นมันวาวและเยิ้ม รูปที่ 19

รูปที่ 19 การพัฒนาการของแคลลัสเป็นต้นอ่อนภายหลังการถ่ายยีนโดยวิธีอะโกรแบคทีเรียม

การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาหลังจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pDFR81 โดยคัดเลือกบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทกซิน ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาที่คัดเลือกจะตายทั้งหมดในระยะเวลา 4 เดือน และมีแคลลัสประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิตรอดในอาหารสูตรดังกล่าว และสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้ในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงนำพืชที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินไปทดลองต่อในการทดลองต่อไป

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *dfr* ในเนื้อเยื่อบอนสีที่ได้รับการถ่ายยีน

5.1 การตรวจสอบการเข้าของยีน *dfr*

การตรวจสอบการเข้าของยีน *dfr* เข้าสู่แคลลัสโดยการนำต้นอ่อนบอนสีทั้ง 3 ตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกด้วยคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินมาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับยีน *dfr* ได้ผลดังรูป

รูปที่ 20 บอนสีมียีน *dfr* หลังการทำ PCR

M = ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 นิวคลีโอไทด์

P = positive control ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพลาสมิดที่มียีน *Dfr*

N = negative control ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบอนสีปกติ

1 = ตัวอย่างบอนสีต้นที่ 1

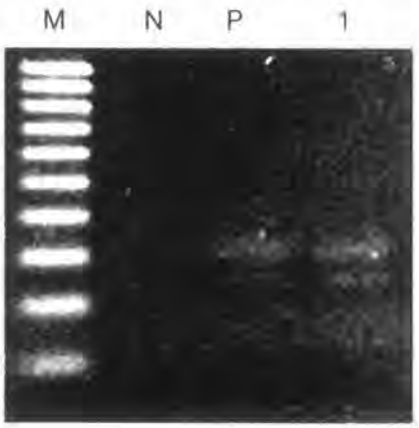
2 = ตัวอย่างบอนสีต้นที่ 2

3 = ตัวอย่างบอนสีต้นที่ 3

จากผลการทำ PCR พบว่าบอนสีต้นที่ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ขนาดคือ 450 นิวคลีโอไทด์ และ 250 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่แสดงถึงการเข้าของยีน *dfr* แต่บอนสีต้นที่ 2 และ 3 แม้จะสามารถตรวจพบว่าสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินได้ก็ตาม แต่ไม่สามารถตรวจพบยีน *dfr* ได้ ซึ่งแสดงถึงความผิดพลาดของการถ่ายยีน *dfr* เข้าสู่ต้นบอนสีต้นที่ 2 และ 3

5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *dfr* ที่ถ่ายเข้าสู่ต้นบอนสี

เมื่อนำต้นบอนสีต้นที่ 1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาต้านทานปฏิชีวนะกานามัยซิน ร่วมกับการยืนยันผลการเข้าของยีน *dfr* เรียบร้อยแล้ว นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ และทำ RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ผลดังรูปที่



รูปที่ 21 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายของบอนสีต้นที่ 1 หลังจากการทำ PCR

M = ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 นิวคลีโอไทด์

P = positive control ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพลาสมิดที่มียีน *Dfr*

N = negative control ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบอนสีปกติ

1 = ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างบอนสีต้นที่ 1

เมื่อนำต้นบอนสีต้นที่ 1 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *dfr* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ขนาด คือ 450 นิวคลีโอไทด์ และ 250 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงว่าต้นบอนสีต้นที่ 1 มีการแสดงออกของยีน *dfr* ภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปจนกระทั่งแคลลัสเจริญเป็นต้นอ่อน