รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จักรพันธ์ วนิธกุล และ สุจิตรา จางตระกูล. 2548. การพัฒนาเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified fragment Length Polymorphism; AFLP) เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul* (Ridl.)Rolfe). กลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช

จารุพันธ์ ทองแถม. 2547. ศักยภาพการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของไทย. ใน เอกสารประกอบการบรรยายเรื่องลิขสิทธิ์พันธุ์พืชกับการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของไทย สถาบันฝึกอบรมการค้าระหว่างประเทศ กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์ 27 สิงหาคม 2547. จำกัด.

ชุติมา คุณาไทย. 2526. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เชษฐา พยากรณ์. 2524. ตะลุยดงบอน. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์เชษฐา.

เตือนใจ โก้สกุล. 2549. เอกสารประกอบการฝึกอบรมวิชาชีพของดครงการพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชกุมารี. สมาคมส่งเสริมและอนุรักษ์บอนสีแห่งประเทศไทย.

นงลักษณ์ อินกองงาม. 2527. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและเซลวิทยาของบอนสี (*Caladium bicolor* Vent.). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บรรเจิด จิ๋วสำอางค์. 2547. พื้นที่ปลูกไม้ดอกไม้ประดับ. สำนักงานเกษตรจังหวัดอุบลราชธานี กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

บุญนาค สีสด. 2544. การปลูกบอนสี. กรุงเทพมหานคร : บริษัทเพาเวอร์วีอินเตอร์เนชันแนล.

เบญจรงค์และอุดม จิรเศวตกุล. 9 มกราคม 2550. ผู้อำนวยการสำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 จ.ขอนแก่น. สัมภาษณ์.

พเยาว์ อินทสุวรรณ. 2548. อนุกรมวิธานของพืช. 500 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่1. ภารกิจการผลิตเอกสารและตำรามหาวิทยาลัยทักษิณ ลำดับที่ 137. สงขลา : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยทักษิณ.

พิชาน. 2549. บอนสี ราชินีแห่งไม้ใบ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ฮาชันพรินติ้ง.

รังสฤษดิ์ กาวีต้ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. กรุงเทพมหานคร :

เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒนะ. 2547. สถานการณ์การผลิตและการตลาดไม้ดอกไม้ประดับในต่างประเทศ. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สจี อิ่มแตง. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทางชีวภาพของปรงสกุล Cycas และ Zamia โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิ กลิ่นอุทัย. 2540. บอนสี ฉบับสมาคมบอนสีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แหล่งที่มา : http://www.vertichrom.com

เสรี เพ็ญสุขสันต์. 2524. การศึกษาลักษณะของพืชตระกูล Araceae บางชนิดที่ใช้รับประทานได้ Morphological study of some edible aroids. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. หลักการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2547. สถานการณ์การผลิตและการตลาดไม้ดอกไม้ประดับ ปี 2547 และแนวโน้มการผลิต การ ตลาด ปี 2547. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อุไร จิรมงคลการ. 2538. บอนสี ราชินีแห่งไม้ใบ. กรุงเทพฯ : บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

เอกดนัย กอกิมพงษ์. การใช้เทคนิค AFLP สำหรับการตรวจสอบ DNA พืช. [online].

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. บอนสี. [online].

แหล่งที่มา : http://www.doae.go.th/library/html/detail/caladium/

ภาษาอังกฤษ

Ahmed, E. U., Hayashi, T., Zhu, Y., Hosokawa, M. and Yazawa, S. 2002. Lower incidence of variants in Caladium bicolor Ait. plants propagated by culture of explants from younger tissue. Scientia Horticulturae. 96: 187-194.

Bailey, L. H. and Hortorium Staff. 1963. Hortus third, a concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. New York: Macmillan.

Barrett, B.A., and K.K. Kidwell. 1998. AFLP-based genetic diversity among wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop Sci. 38:1261–1271.

Birdsey, M.R. 1951. The cultivated aroids.

Brandes, A., H. Thompson, C. Dean and J. S. Heslop-Harrison. 1997. Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of Arabidopsis thaliana L. Chromosome Res. 5: 238–246.

Chen, C. F., Goyette, P., and Lohnes, D. 2004. RARgamma acts as a tumor suppressor in mouse keratinocytes. Oncogene 23, 5350–5359.

Croat, T. 1992. Taxonomic status of neotropical Araceae. Aroideana 13 (1-4): 44-3. 1990.

Croat, T. 1994. The use of New World Araceae as drug plants. Japanese Journal of Botany 69: 185-203.

Daneil J. Perry and J. Bousquet, 1998 . Sequence – Tagged – Site (STS) Markers of Arbitary Genes: Development, Characterization and Analysis of Analysis of Linkage in Black Spruce. The Genetics Society of America. 149 :1089-1098.

Deng, Z., B.K. Harbaugh, R.K. Schoellhorn, and R.C. Andrew. 2005. 2003 Survey of the Florida caladium tuber production industry. UF/IFAS Extension Fact Sheet ENH 1007, 6 p.

Deng, Z., B.K. Harbaugh, R.O. Kelly, T. Seijo and R.J. McGovern. 2004. Pythium root rot resistance in commercial caladium cultivars. Hort Science. 40:549-552.

Dice, L.R.1945. Measures of the amount of ecology association between species. Ecology .26:297-302.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1991. isolation of plant DNA from fresh tissure. Focus 12(1):13-15.

E.U. Ahmed, T. Hayashi, Y. Zhu, M. Hosokawa, S. Yazawa. 2002. Lower incidence of variants in Caladium bicolor Ait. plants propagated by culture of explants from younger tissue. Scientia Horticulturae. 96:187-194.

Ellis, T. H. N., S. J. Poyser, M. R. Knox, A. V. Vershinin and M. J. Ambrose. 1998. Ty1-copia class retrotransposon insertion site polymorphism for linkage and diversity analysis in pea. Mol.Gen. Genet. 260: 9–19.

Evans, M. R., Wilfert, G. J. and Harbaugh, B. K. 1993. Caladiums as potted and landscape plants. Circular 1060. Florida: University of Florida.

Flavell, A. J., M. R. Knox, S. R. Pearce and T. H. N. Ellis. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. Plant J. 16: 643–650.

Govaerts, R. and D.G. Frodin. 2002. World checklist and bibliography of Araceae.

Graf, Alfrad Byed. 1978. Tropica. New Jersey, U.S.A. : Roehrs Company.

Hayward, A. L., *et al.* 1998. Modeling and analysis of competitive RT-PCR. Nucleic Acids Research. 26: 2511-2518.

Huxley, Anthony. 1992. The Royal Horticutural Society. Dictionary of Gardens. Vol. 1-4. England :The Macmillan Press Limited.

Kalendar, R., T. Grob, M. Regina, A. Suoniemi and A. H. Schulman. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposonbased DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet. 98: 704–711.

Kaufman PD, et al. 1998. Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in Saccharomyces cerevisiae in the absence of chromatin assembly factor I. Mol Cell Biol 18(8):4793-806.

Koes, R. E., Blokland, V. R., Quattrocchlo, F., Tunen, A. J. and Mol, J. N. M. 1990. Chalcone synthase promoters in petunia are active in pigmented and unpigmented cell types. Plant Cells. 2: 379-392.

Koes, R. E., *et al.* 1990. Chalcone Synthase Promoters in Petunia Are Active in Pigmented and Unpigmented Cell Types. Plant Cell 2 : 379-392.

Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N. and Matzuk, M.M. (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility.Nature Genet., 15: 201-204.

Lawrence, G.H.M. 1960. Taxonomy of Vascular Plants. New York : The Macmillan Co.

Li BJ, Wang JF, Xu ZF, Xu YQ, Yu MZ, He X, Shen Y.1994. Integration and expression of human growth hormone gene in Caladium bicolor. Sci China B. 37(3):280-5.

Li, S.J., X.M. Deng, H.Z. Mao, Y. Hong.2004. Enhanced anthocyanin synthesis in foliage plant Caladium Bicolor. Plant Cell Reports.

Loh JP, Kiew R, Set O, Gan LH, Gan YY. 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of 16 banana cultivars (Musa spp.). Molecular Phylogenetics and Evolution 17: 360–366.

Loh, J. P., R. Kiew, et al. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) provides molecular markers for the identification of Caladium bicolor cultivars. Annals of Botany. London. Aug. 84(2): 155-161.

Mackill, D. J., Z. Zhang, E. D. Redona and P. M. Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39:969-977.

Madison, M. 1981. Notes on Caladium (Araceae) and its allies. Selbyana 5 : 342-377.

Maughan, P.J., M.A. Saghai Maroof and G.R. Buss. 1996. Molecular-marker analysis of seed-weight: Genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. Theor. Appl. Genet. 93:574–579.

Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad USA 74 : 560-564.

Maxam AM, Gilbert W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol 65 : 499-560.

Mayo, S.J., J. Bogner, & P.C. Boyce. 1997. The genera of Araceae. Royal Botanic Gardens, Kew.

Murashage, T. and Skoog. F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Murray MG and Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA.Nucleic Acids Res 8: 4321–4325.

Nyborn, H., S.H. Rogstar and B.A. Schaal. 1990. Genetic variation detected by use of the M13 DNA fingerprint probe in *Malus, Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). Theor Appl. Genet 79 : 153-156.

Paul S, Wachira FN, Powell W, Waugh R.1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (Camellia sinensis (L.) O Kuntze) revealed by AFLP markers. Theor Appl. Genet. 94:255–263

Pearce, D., Cline, W., Achanta, A., Fankhauser, S., Pachauri, R., Tol, R., Vellinga, P.1996. The social costs of climate change: greenhouse damage and the benefits of control. In: Bruce, J.P., Lee, H., Haites, E.F. (Eds.), Climate Change 1995: Economic and Social Dimensions—Contribution of Working Group III to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 179–224.

Rohlf, F. J. 1997. NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), version 2.0 Exeter Sofware, New York.

Sahavacharin, O. 1982. Rapid propagation of caladium through tissue culture. In: Plant Tissue Culture. Proceedings of the Fifth International Congress Plant Tissue and Cell Culture, 699-700.

Sambrook, J. ; Maniatis, T. and Frisch, E. F..1989. Molecular cloning : A laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Sping Habor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., and Couison, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitotrs. Proc. Natl. Acad. Sci USA 74 : 5463-5467.

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(12): 5463-5467.

Sneath PHA Sokal RR.1973. Numerical taxonomy. WH Freeman and Co., San Francisco, p 573

Streif, J., I. T. , Agar, J. M. , Garcia. 1998. Effect of O_2 and CO_2 concentrations and low temperature on the growth of Botrytis cinerea. In: Non-conventional Methods for the Control of Postharvest Disease and Microbiological Spoilage, Proceedings of the E.C., COST 914 and COST 915 Joint Workshop, Brussels,pp. 215–219.

Swingle, D.B. 1946. A Text Book of Systematic Botany. New York : McGraw-Hill Book Company.

Tanaka, Y., *et al.* 1996. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. Plant Cell Physiol. 37: 711-716.

Vos, P. R., *et al.* 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Aci. Res. 23:4407-4414.

Wang X, Olsen O and Knudsen S. 1999. Expression of the dihydroflavonol-4-reductase gene in an anthocyanin-free barly mutant. Hereditas 199(1) : 67-75.

Waugh, R., N. Bonar, E. Baird, B. Thomas, and A. Graner.1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. Mol. Gen. Genet. 255:311-321

Weber, D., and T. Helentjaris. 1989. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocation. Genetics.121: 538-590.

Weber, D.and T. Helentjaris. 1989. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocation. Genetics 121 : 538-590.

Wiesman, Z., *et al.* 1998. Molecular characterization of common Olive varieties in the West Bank using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Maker. J. Amor. Soc. Hort. Sci. 123(5) : 837-841.

Zabear, M., and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application no. 92402629.7, publication no. 0 534 858 Al.

Zhu, Y., Takemoto, T., Yazawa, S.1993. Leaf color of plants regenerated through in vitro culture from variegated leaf segments of caladium. Japan Society of Horticultural Science 62, 619-624

Zhu, Z. Q. 1984. Tissue culture and plant regeneration in Caladium. Acta Botanica Sinica 26(6) : 574-579.

Yu Zhu, AhmedE.U., T.Takemoto, , T.Hayashi, Y. Yazawa. 1998. The frequency of leaf variegation in *Caladium* plant regenerated through *in vitro* culture depends on the explants age. J. Japan Soc. Hort. Sci. 67:244.

Greater Lake Placid Florida Chamber of Commerce. Caladium festival. [online] Avalible form : http://www.lpfla.com/

Speedwinds Nutrition Inc. HGH-Human Growth Hormone. [online] Avalible form : http://www.lpfla.com/

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

AB medium

Stock 1

K_2HPO_4	12	g
$NaHPO_4$	4	g
เติม H_2O ให้ครบ	200	ml

Stock 2

NH_4Cl	4	g
$MgSO_4.7H_2O$	1.2	g
KCl	0.6	g
$CaCl_2$	0.6	g
$FeSO_4.7H_2O$	10	mg
เติม H2O ให้ครบ	200	ml

Stock 3

Glucose	20	g
เติม H_2O ให้ครบ	200	ml

LB (1,000 cc)

Bacto-tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	10	g
Agar	15 %	
pH	7.5	

MS agar (Murashige and Skoog,1962)

Stock MS1 (100X)	**สารเคมีต่อน้ำ 1 ลิตร**
แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium Nitrate) NH_4NO_3	165 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate) KNO_3	17 กรัม
บอริคแอซิด (Boric Acid) H_3BO_3	620 มิลลิกรัม
แมงกานิสซัลเฟต (Manganese Sulphate) $MnSO_4.7H_2O$	2,230 มิลลิกรัม
ซิงซัลเฟต (Zinc Sulphate) $ZnSO_4.7H_2O$	860 มิลลิกรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์ (Potassium Iodide) KI	83 มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิปเดต (Sodium Molybdate) $Na_2MoO_4.2H_2O$	25 มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulphate) $CuSO_4.5H_2O$	2.5 มิลลิกรัม
โคบอลคลอไรด์ (Cobalt Chloride) $CoCl_2.6HO$	2.5 มิลลิกรัม
Stock MS2 (100X)	**สารเคมีต่อน้ำ 1 ลิตร**
โปแตสเซียมไนเตรต (Potassium Nitrate) KNO_3	190 กรัม
Stock MS3 (100X)	**สารเคมีต่อน้ำ 1 ลิตร**
แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride) $CaCl_4.2HO$	44 กรัม
Stock MS4 (100X)	**สารเคมีต่อน้ำ 1 ลิตร**
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulphate) $MgSO_4.7H_2O$	37 กรัม
Stock MS5 (100X)	**สารเคมีต่อน้ำ 1 ลิตร**
โซเดียม อีดีทีเอ (Sodium Ethylenediamine Tetra-acetate) Na_2EDTA	3.73 กรัม
เฟอรัสซัลเฟต (Ferrous Sulphate) $FeSO_4.7H_2O$	2.78 กรัม
Stock MS6 (200X)	**สารเคมีต่อน้ำ 1 ลิตร**
ไมโยอิโนซิตอล (Myo-Inositol)	20 กรัม
นิโคตินิคแอซิด (Nicotinic Acid)	100 มิลลิกรัม
ไพรีดอกซีนไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine Hydrochloride)	100 มิลลิกรัม
ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine Hydrochloride)	20 มิลลิกรัม
ไกลซีน (Glycine)	400 มิลลิกรัม

วิธีการเตรียมอาหารสูตร Murashige และ Skoog 1 ลิตร

1 Stock MS 1 10 มิลลิลิตร
Stock MS 2 10 มิลลิลิตร
Stock MS 3 10 มิลลิลิตร
Stock MS 4 10 มิลลิลิตร
Stock MS 5 10 มิลลิลิตร
Stock MS 6 5 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำตาล 30 กรัม
3. เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร
4. ปรับ pH ให้ได้ 5.6
5. ใส่วุ้น 6.2 กรัม ต้มวุ้นจนละลาย
6. เทลงในขวดแก้ว ปิดฝา
7. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB

1. นำชิ้นส่วนของพืชหนักประมาณ 300 mg บดให้ละเอียดแล้วเติม CTAB buffer 600 ul. เขย่าให้เข้ากัน จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. เติม Phenol:Chloroform 500 ul. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
3. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม chloroform:isoamylacohol (24:1) 500 ul นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
4. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม isoproponal ในอัตราส่วนเท่ากับส่วนใสที่ได้ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
5. เก็บ pellet ที่ได้ โดยเทส่วนใสทิ้ง และเติม 70% ethanol 1000 ul. ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี pellet อยู่ จึงนำไป หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
6. เท 70% ethanol ออกทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่อง centrifugal vaporizer เป็นเวลา 10 นาที
7. ละลายใน TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)30 ul จึงเติม RNase 2 ul จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. เติม CTAB buffer 200 ul. และ chloroform:isoamylacohol 250 ul. เขย่าให้เข้ากัน จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
9. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม isoproponal ในอัตราส่วนเท่ากับส่วนใสที่ได้ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
10. เก็บ pellet ที่ได้ โดยเทส่วนใสทิ้ง และเติม 70% ethanol 1000 ul. ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี pellet อยู่ จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
11. เท 70% ethanol ออกทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่อง centrifugal vaporizer เป็นเวลา 10 นาที
12. นำ pellet ที่ได้ ละลายใน TE buffer 30 ul โดยสามารถเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธี optical method

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถใช้หลักการการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการนำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ได้รับการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนที่ต้องการ จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จึงนำผลที่ได้มาคำนวณจากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (μl/ml) = A_{260} x 50 x dilution factor

คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ = A_{260}/A_{280}

หมายเหตุ : 1.0 A_{260} = 50 ug./ml. (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)

- ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ = 1.65-1.85 คือ สกัดได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่บริสุทธิ์
- ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่า 1.65 คือ มีโปรตีนหรือฟีนอลปะปน
- ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอมากกว่า 1.85 คือ มีอาร์เอ็นเอปะปน

วิธีการตรวจสอบและแยกดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

1. เตรียมอะกาโรสเจล 1% ใส่ใน flask เติม 1xTAE buffer เขย่าให้เข้ากัน
2. ต้มในไมโครเวฟเพื่อให้เจลละลาย
3. เทลงในถาดเตรียมเจลหนาประมาณ 4.5 mm
4. ทิ้งไว้ให้เย็น ดึงหวีเสียบออกแล้ววางแผ่นเจลลงในเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส ให้ด้านหลุมตัวอย่างอยู่ทางด้านขั้วลบ
5. เท 1xTAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล
6. หยอดตัวอย่างและดีเอ็นเอมาตรฐาน (ใช้เปรียบเทียบขนาดและปริมาตรดีเอ็นเอ) เริ่มจากหลุมทางซ้ายมือไปยังหลุมทางขวามือ
7. เสียบขั้วไฟฟ้าและเปิดเครื่อง ปรับระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ นาน 30 นาที
8. ปิดเครื่อง ย้ายแผ่นเจลแช่ในน้ำกลั่นที่มีเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 15 นาที
9. ล้างแผ่นเจลในน้ำหลายครั้ง ก่อนนำไปส่องภายใต้เครื่องอัลตราไวโอเลต สังเกตแถบดีเอ็นเอ ถ่ายภาพพร้อมบันทึกผล
10. หลังการถ่ายรูป บันทึกขนาดและรูปแบบดีเอ็นเอแล้วทำความสะอาดเครื่องโดยเช็ดด้วยกระดาษทิชชู และน้ำน้ำกลั่น

ภาคผนวก ค

ข้อมูลทางสถิติของผลการทดลอง

ตารางแสดงการพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนต้นอ่อน (ต้น)			
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
ชุดควบคุม	1.9^{cd}	3.0^{cd}	4.8^{b}	5.4^{bc}
0 ppm NAA 1 ppm BA	4.8^{a}	8.5^{a}	11.9^{a}	13.1^{a}
0 ppm NAA 2 ppm BA	2.2^{c}	3.9^{c}	4.8^{b}	5.2^{c}
1 ppm NAA 0 ppm BA	2.0^{cd}	2.4^{de}	2.8^{c}	2.9^{d}
1 ppm NAA 1 ppm BA	2.7^{b}	5.1^{b}	5.6^{b}	6.4^{b}
1 ppm NAA 2 ppm BA	2.0^{cd}	2.5^{de}	2.8^{c}	3.0^{d}
2 ppm NAA 0 ppm BA	0.5^{f}	1.0^{f}	1.0^{d}	1.0^{e}
2 ppm NAA 1 ppm BA	1.5^{d}	1.8^{ef}	1.9^{cd}	1.9^{de}
2 ppm NAA 2 ppm BA	1.0^{e}	1.5^{ef}	1.5^{d}	1.5^{e}
% C.V.	26.9	31.8	26.4	26.61
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT)

ตารางแสดงการพัฒนาการเจริญของใบอ่อนของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนใบ (ต้น)			
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
ชุดควบคุม	0.0^{b}	2.2^{b}	4.8^{b}	5.7^{b}
0 ppm NAA 1 ppm BA	1.1^{a}	3.3^{a}	10.2^{a}	13.7^{a}
0 ppm NAA 2 ppm BA	0.0^{b}	1.2^{c}	4.1^{b}	5.8^{b}
1 ppm NAA 0 ppm BA	0.0^{b}	1.0^{cd}	2.7^{c}	3.4^{b}
1 ppm NAA 1 ppm BA	0.0^{b}	1.2^{c}	4.9^{b}	6.8^{b}
1 ppm NAA 2 ppm BA	0.0^{b}	1.0^{cd}	2.5^{c}	3.2^{b}
2 ppm NAA 0 ppm BA	0.0^{b}	1.0^{cd}	1.3^{e}	1.2^{d}
2 ppm NAA 1 ppm BA	0.0^{b}	0.8^{cd}	2.0^{de}	2.2^{cd}
2 ppm NAA 2 ppm BA	0.0^{b}	0.6^{d}	1.0^{e}	1.6^{d}
% C.V.	81	40	26	19.79
F-test	**	**	**	*

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT)

ตารางแสดงการพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนของใบอ่อนของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนราก (ต้น)			
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
ชุดควบคุม	0.0^{b}	0.0^{c}	0.0^{c}	0.0^{e}
0 ppm NAA 1 ppm BA	0.0^{b}	0.0^{c}	0.0^{c}	0.0^{e}
0 ppm NAA 2 ppm BA	0.0^{b}	0.0^{c}	1.0^{c}	1.6^{d}
1 ppm NAA 0 ppm BA	0.0^{b}	0.0^{c}	0.0^{c}	0.0^{e}
1 ppm NAA 1 ppm BA	0.0^{b}	1.7^{b}	3.3^{b}	4.7^{b}
1 ppm NAA 2 ppm BA	0.0^{b}	2.2^{b}	3.9^{b}	5.2^{b}
2 ppm NAA 0 ppm BA	0.2^{a}	3.6^{a}	6.4^{a}	8.7^{a}
2 ppm NAA 1 ppm BA	0.0^{b}	2.1^{b}	4.1^{b}	5.2^{b}
2 ppm NAA 2 ppm BA	0.0^{b}	1.7^{b}	3.0^{b}	3.5^{c}
% C.V.	0.0	68	41	39.5
F-test	NS	**	**	*

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT)

ตารางแสดงการพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนของใบอ่อนของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความสูงของยอด			
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
ชุดควบคุม	8.3^{bcd}	21.2^{b}	28^{b}	32.8^{bcd}
0.0 ppm NAA 1.0 ppm BA	8.6^{bc}	25.7^{a}	31.3^{b}	35.4^{bc}
0.0ppm NAA 2.0 ppm BA	7.8^{bcd}	17.2^{cd}	22^{de}	27^{cde}
1.0 ppm NAA 0.0 ppm BA	11.2^{a}	27.9^{a}	37.1^{a}	60.7^{a}
1.0 ppm NAA 1.0 ppm BA	8.0^{bcd}	18.7^{bc}	23.5^{cd}	26.9^{cde}
1.0 ppm NAA 2.0 ppm BA	6.8^{d}	15.5^{cd}	17.8^{ef}	20.3^{e}
2. 0 ppm NAA 0.0 ppm BA	7.5^{bcd}	16.1^{cd}	20^{def}	26.7^{cde}
2.0 ppm NAA 1. 0 ppm BA	7.4^{cd}	14.0^{d}	16.2^{f}	22.8^{de}
2. 0 ppm NAA 2.0 ppm BA	9.0^{b}	22^{b}	27.5^{bc}	39.7^{b}
% C.V.	17.67	20.98	8.71	33.05
F-test	**	**	**	**

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT)

ภาคผนวก ง

การทำปฏิกิริยา AFLP ใช้วิธีการของ VOS และคณะ (1995)

1. Digestion

นำดีเอ็นเอของพืชซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 0.5µg มาย่อยด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI (5 unit) และ *Mse*I (5 unit) ในบัฟเฟอร์ชนิด A (Borhringer Mannheim) (33 mM Tris-HCL ph 7.5, 10 mM KCl และ 0.5 mM DTT) ในปริมาตร 40 µl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. Ligation

นำดีเอ็นเอที่ถูกย่อยแล้วมาต่อด้วย adapter ที่มีลำดับเบสตรงกับที่จดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด (*Eco*RI-adapter และ *Mse*I-adapter) โดยการเติมบัฟเฟอร์ 10 µl ที่ประกอบด้วย 50 pmol *Eco*RI-adapter, 50pmol *Mse*I-adapter, 30mMTris-HClph 7.8 10 mM DTT ,1 mM ATP (10X Ligase buffer)(Promega) และ 1 unit T4 DNA ligase ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 10 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. Pre-amplification (PCR I)

นำดีเอ็นเอที่ทำการย่อยและต่อกับ adapter แล้ว และเจือจางลง 10 เท่า ปริมาตร 5 µl นำมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มี selective nucleotide เบส 1 เบส โดยใช้ไพรเมอร์ด้าน *Eco*RI และ *Mse*I ปริมาณ 70 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 50 mM $MgCl_2$, 10X PCR buffer, 2.5 mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 1 unit ในปริมาตรรวม 50 µl ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (เครื่อง PCR) มีรายละเอียดของอุณหภูมิดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 เท่า และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4. Amplification (PCR II)

นำ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากขั้นตอน PCR I 3 µl ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการคัดเลือกชิ้นที่จะเพิ่มปริมาณด้วย ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับ adapter แต่มีปลายยื่นจาก adapter ด้วย 3' จำนวน 3 เบส (+3 selective nucleotide) ปฏิกิริยาประกอบด้วย *Eco*RI และ *Mse*I primer ปริมาณ 30 นาดนกรัม , 50 mM $MgCl_2$, 10X PCR buffer, 2.5 mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 0.4 unit ในปริมาตรรวม 20 µl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยการลดอุณหภูมิลงทุก 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิ 56 องศาสเซลเซียส (เฉพาะขั้นตอน annealing) 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 34 รอบ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

อัตโนมัติ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเติม 10 µl loading dye (95%formamide, 10 mM NaOH, 0.5% Bromophenol Blue และ 0.05% xylene cyanol)

5. การตรวจสอบผลปฏิกิริยา AFLP

นำดีเอ็นเอ 10 µl จาก PCR II ที่เติม loading dye แล้วมาตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณด้วย 1 % agarose ใน 0.5 XTBE โดยการสังเกตจากแถบดีอ็นเอประมาณแถบสีของ Bromphenol Blue จากนั้นนำมาวิเคราะห์แยกแถบสีดีเอ็นเอโดยการผ่าน 4.5 % denatured polyacrylamide gel electrophoresis โดยการใช้ดีเอ็นเอที่ทำให้เป็นเส้นเดี่ยวที่อุณหภูมิ96 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที และลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง โดยการใช้ปริมาตร 5 µl ใช้ 1X TBE เป็นบัฟเฟอร์ กระแสไฟฟ้า 40 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา ประมาณ 45 นาที (หรือจนกว่าสี Xylene cyanol คือสีที่อยู่ด้านบนจะเคลื่อนลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล) จากนั้นแยกกระจกทั้ง สองออกจากกันแล้วนำไปย้อมสีด้วยวิธี Silver staining โดยการเขย่าเบา ๆ ใน 10% acetic 20 นาที (เมื่อใช้เสร็จแล้วเก็บ10% acetic ไว้ก่อน) จากนั้น ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที และเขย่าเบา ๆ ในสารละลาย Silver staining (1g Silver nitrate และ 1.5 ml 37% formaldehyde ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เกิดแถบสีด้วย developer solution (30g Na_2Co_3 , 1.5 ml 37% formaldehiyde, 2 mg $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่แช่เย็น เขย่าจนปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid ในปริมาตรที่เท่ากัน ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 นาที ทิ้งไว้ในอากาศจนแห้ง

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic bands) โดยให้ 1 แทนแถบที่ปรากฏในตำแหน่ง (loci) นั้น ๆ และ 0 แทนตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

2. นำมาหาค่า similarity coefficient โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของ Dice (1945)=2Nx,y/Nx+Nyโดยที่ Nxy คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันระหว่างพันธุ์ที่ x และพันธุ์ที่ y, Nx และ Ny เป็นจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในพันธุ์ที่ x และพันธุ์ที่ y

3. จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA และใช้โปรแกรม NTSYS-pc Ver.2.0 (Rohlf, 1997) ในการวิเคราะห์

การเตรียมสารเคมีในขั้นตอน silver staining

10% Acetic acid (1 ลิตร)

dH_2O	900	ml
Acetic acid	100	ml

Silver stain (1 ลิตร)

dH_2O	1000	ml	
Silver Nitrate	1	g	
Formaldehyde 37%	1.5	ml	

Developer (1 ลิตร)

dH_2O	1000	ml	
Na_2CO_3	30	g	
Formaldehyde 37%	1.5	ml	
Sodiumthiosulfate (10 mg/ml)	200	µl	

การเตรียมเจลสำหรับกระจก

4.5% acrylamide gel	50	ml	
10% APS	300	µl	
TEMED	100	µl	

AFLP Reaction

Digestion

DNA (100 ng/µl)	5	µl	
MseI	0.5	µl	
*Eco*RI	0.5	µl	
10Xbuffer A	4	µl	
dH_2O	30	µl	
Total	40	µl	Incubate 37 °C 1 ชั่วโมง

Ligation

ER adapter (5 pmol/µl)	1	µl	
MS adapter (5 pmol/µl)	1	µl	
T4 DNA ligasw	0.4	µl	
10X ligase buffer	1	µl	
dH_2O	6.6	µl	
Total	10	µl	Incubate 37 °C 3 ชั่วโมง

Add dH_2O 450 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

PCR I Reaction

DNA	5	µl
ERA (70ng/µl)	1	µl
MSC (70ng/µl)	1	µl
10xPCR buffer	5	µl
dNTP (2.5 mM)	4	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5	µl
Taq polymerase (2U/ µl)	0.5	µl
dH_2O	32	µl
Total	50	µl

Dilute dH_2O 450 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C

PCR II Reaction

DNA	3	µl
E+3 primer (30ng/ µl)	1	µl
M+3 primer (30ng/ µl)	1	µl
10X PCR buffer	2	µl
dNTP (2.5 mM)	1.6	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0.6	µl
Taq polymerase (2 unit/ µl)	0.25	µl
dH_2O	10.55	µl
Total	20	µl

แสดงลำดับเบสของเอนไซม์ adapter และไพรเมอร์ต่าง ๆ ดังนี้

*Eco*RI 5' ...G"AATC...3'

3'...CTTAA"G...5'

*Mse*I 5'...T"TAA...3'

3'...AAT"T...5'

*Eco*RI adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

*Mse*I adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ศิริพร คุ้มแว่น เกิดวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2521 ที่โรงพยาบาลแมคคอมิค อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2546 รางวัลที่ได้รับ รางวัลชนะเลิศในการแข่งขันกีฬาเทควันโด้ รายการ "ไทยแลนด์โอเพ่น" รุ่นเฮฟวี่เวท ชิงแชมป์แห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2536 จัดโดยสมาคมเทควันโด้แห่งประเทศไทย และได้รับเกียรติบัตรผู้มีความสามารถทางด้านกีฬาเทควันโด้ดีเด่น ประจำปีการศึกษา 2538 จากโรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัยนนทบุรี